

**FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON**

ANNÉE 1966 - N° 26

THÈSES

présentées

à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON
et soutenues publiquement le 21 Juin 1966, pour obtenir le grade
de

Docteur en Pharmacie
(Doctorat d'Etat)

par

Olivier CREACH

né le 27 Juillet 1932, à SANTEC (Finistère)

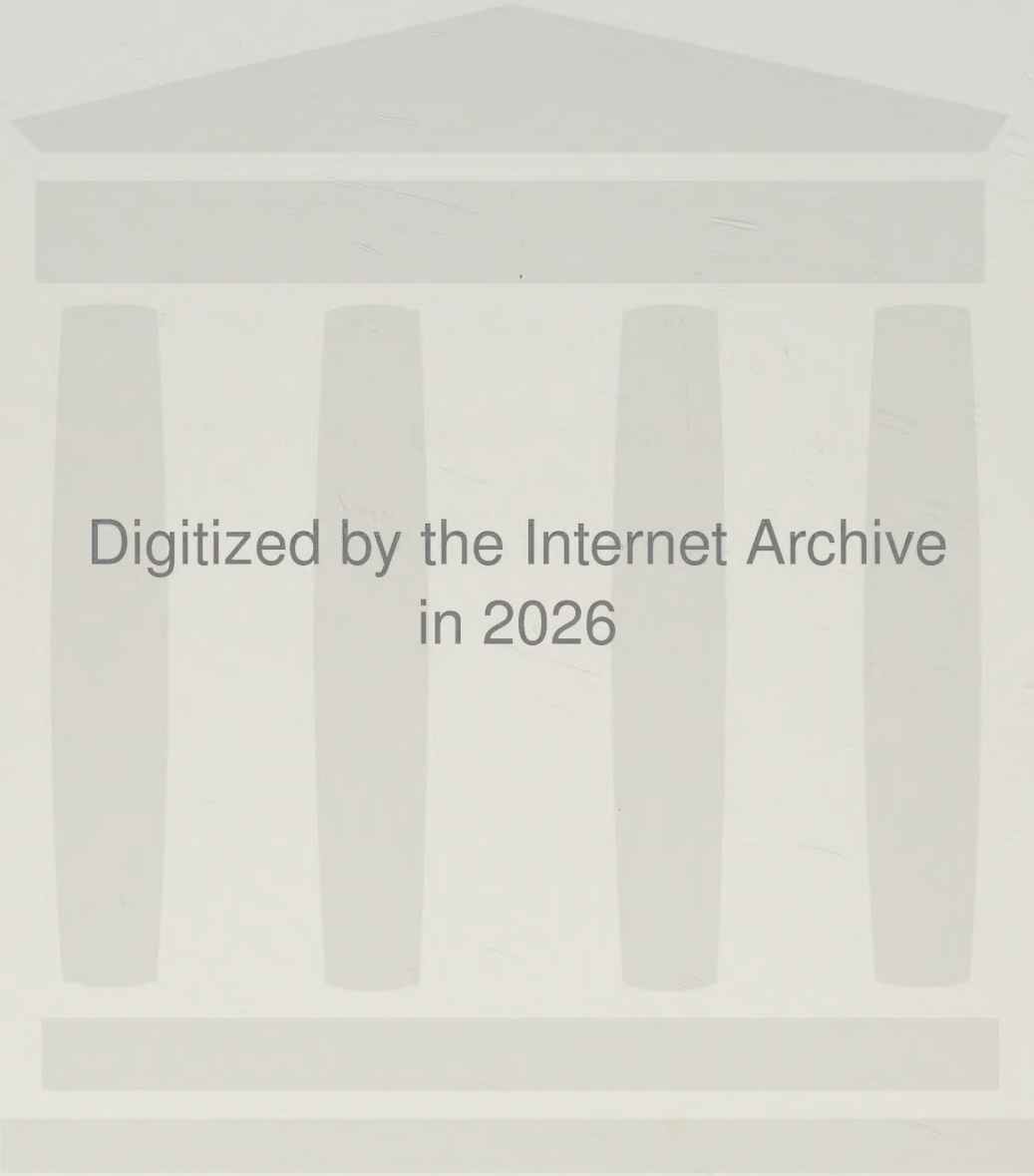
**1 - Contribution à l'étude des propriétés
biologiques de lipides constitutifs
de l'endotoxine d'Eberthella typhi**

2 - Propositions données par la Faculté

Examineurs de Thèses

MM. A. CIER	}	Président
A. BADINAND		Assesseurs
J. GRAS		
L. COLOBERT		

Contribution à l'étude des propriétés
biologiques de lipides constitutifs
de l'endotoxine d'*Eberthella typhi*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553403_0019

Travail de la Division de Microbiologie du Centre de Recherches
du Service de Santé des Armées

(Chef de Division : Médecin Lieutenant-Colonel COLOBERT)

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

ANNÉE 1966 - N° 26

THÈSES

présentées

à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON
et soutenues publiquement le 21 Juin 1966, pour obtenir le grade

de

Docteur en Pharmacie
(Doctorat d'Etat)

par

Olivier CREACH

né le 27 Juillet 1932, à SANTEC (Finistère)

**1 - Contribution à l'étude des propriétés
biologiques de lipides constitutifs
de l'endotoxine d'Eberthella typhi**

2 - Propositions données par la Faculté

Examineurs de Thèses

MM. A. CIER	Président
A. BADINAND	} Assesseurs
J. GRAS	
L. COLOBERT	



PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens Honoraires :

M. J. LEPINE - Membre de l'Institut
M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen : M. J.F CIER

Assesseurs : M. M. LEVRAT
M. L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PATEL - LEPINE - TRILLAT - MOURQUAND - GARIN - GATE - MARTIN - GABRIELLE -
SANTY - DUCLOS - GUILLEMINET - HERMANN - ROCHET - POLLOSSON - ENSELME -
WERTHEIMER.

PROFESSEURS

MM. CIBERT	Clinique Urologique
PONTHUS	Physique biologique
DECHAUME	Clinique Neuro-psychiatrique et d'Hygiène mentale
CHAMRON	Chimie organique et toxicologie
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale C
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
REVOL	Pharmacie galénique
PIGEAUD	Clinique obstétricale
BOURRET	Médecine du travail
LEVRAT	Clinique médicale A
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
NETTEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine Légale et déontologie
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie
CREYSSEL	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique

MM. DARGENT	Clinique carcinologique
GUICHARD	Anatomie pathologique
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD Marcel	Clinique médicale D
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique médicale infantile et hygiène du 1er âge
GONIN	Thérapeutique
MONNET	Bactériologie
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales
CHATONNET	Physiologie B
GUINET	Clinique endocrinologique
TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique
FREIDEL	Clinique stomatologique
MARION Joseph	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles
DORCHE	Matière médicale et législation pharmaceutique
DUMONT Louis	Histologie et embryologie
PERROT	Chimie
CIER J.F.	Physiologie A
PERRIN J.	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
MICHAUD Pierre	Clinique de chirurgie cardiaque
MATHIEU	Clinique gynécologique
FAUCON	Biologie médicale et pharmacodynamie
BERTOYE	Clinique des maladies infectieuses
VIGNON	Hydrologie
CIER André	Pharmacodynamie
VINCENT D.	Biochimie appliquée
X.....	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale
X.....	Chimie biologique et médicale
X.....	Clinique chirurgicale B
X.....	Clinique médicale infantile B

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM. EERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
MANSUY	Neuro-chirurgie
COLLET	Chimie générale et pharmaceutique
LACROIX	Hygiène et climatologie
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique
LECUIRE	Neuro-chirurgie
REVOL	Médecine générale
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale
PONT Maurice	Médecine générale
TRAEGER	Pathologie métabolique et rénale

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. ROMAN	Parasitologie
FEROLDI	Anatomie pathologique
MORET	Physique biologique
ODDOUX	Botanique et cryptogamie
De SOLLIERS	Chimie analytique
DESPIERRES	Médecine générale
GARIN	Parasitologie
TOLOT	Médecine du Travail
THIVOLET	Hygiène

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

CREYSSEL Roger	Chimie biologique
PINET	Electro-radiologie
GUYUTAT	Neuro-psychiatrie
DESCOTES	Chirurgie générale
JOUVET	Pathologie expérimentale
PEYRIN	Physique biologique
TOMMASI	Anatomie pathologique
BUFFARD	Electro-radiologie
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
De MOURGUES F.	Stomatologie
NAUSSAC	Maladies infectieuses
REBOUILLAT	Chirurgie générale
ROMAGNY	Pédiatrie
DELAHAYE	Médecine générale
DELEUZE	Anesthésiologie
GIRAUD	Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique
MICHEL	Anesthésiologie
FRANCOIS	Pédiatrie et Puériculture
MICHOULIER	Chirurgie générale
COLOMB	Dermatologie
LAMBERT	Médecine générale
FRIES	Médecine générale
GILLY	Pédiatrie
ROBERT	Médecine générale
BOUCHET	Anatomie
BETHENOD	Pédiatrie
GERMAIN	Immunologie, sérologie, hématologie
KALB	Pneumo-phthisiologie
LARBRE	Pédiatrie
SOUSTELLE	Chirurgie générale
VIALA	Médecine générale

MM. VINCENT	Bactériologie, parasitologie, virologie
GIROD	Histologie et embryologie
GRAS	Chimie biologique
MALLEIN	Chimie analytique
COLIN	Médecine légale
BERTRAND	Chimie biologique
MARET	Chirurgie générale
VIALLIER-RAYNARD	Bactériologie
CHOLLAT	Electro-radiologie
FLEURETTE	Bactériologie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

FAVRE-GILLY	Hématologie
RIFFAT	Hygiène
FLANDROIS	Physiologie
ROLLET	Pharmacie galénique

AGREGES EN EXERCICE

MARION Pierre	Chirurgie générale
BONAMOUR	Ophtalmologie
De MOURGUES Georges	Chirurgie générale
DEVIC	Médecine générale
DUMONT Martial	Obstétrique
DURAND	Urologie
FRANCILLON	Chirurgie générale
SAUBIER	Chirurgie générale
SCHOTT	Neuro-Psychiatrie
ALLEGRE	Neuro-chirurgie
CHASSARD	Electro-radiologie
FAYSSE	Orthopédie
GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie
GARDE	Médecine générale
HUGONNIER	Ophtalmologie
MORNEX	Médecine générale
MOUNIER-KUHN Alain	Chirurgie générale
NORMAND	Médecine générale
PERRIN André	Médecine générale
DUMAS	Stomatologie
GARMIER	Obstétrique
NOEL	Médecine générale
SCHNEPP	Orthopédie
NOTTER	Gynécologie obstétricale

Examineurs de la thèse :

- Président : M. le Professeur André C I E R
- Assesseurs : MM. BADINAND, GRAS, COLOBERT.

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur A. CIER

Professeur de Pharmacodynamie
Maître de Recherches du Service
de Santé des Armées.

Tout au long de nos études et de notre carrière militaire nous n'avons jamais cessé de bénéficier de sa bienveillance, de son aide et de ses conseils.

Nous sommes très sensible à l'honneur qu'il nous fait d'accepter la présidence de cette thèse et nous le prions de bien vouloir trouver ici le témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

Monsieur le Professeur A. BADINAND

Professeur de Chimie Analytique Pharmaceutique
Pharmacien des Hôpitaux.

Au cours de nos études à la Faculté, nous avons pu apprécier la richesse et la clarté de son enseignement. Il a toujours fait preuve d'une grande bienveillance à notre égard et nous lui sommes reconnaissant d'avoir bien voulu s'intéresser à notre travail en acceptant d'être notre juge.

Nous voudrions lui présenter ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur Agrégé J. GRAS

Maître de Conférences - Agrégé de Chimie Biologique

Nous avons trouvé auprès de lui un accueil extrêmement cordial.

Nous le remercions d'avoir bien voulu accepter de juger cette thèse et nous lui exprimons notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur L. COLOBERT

Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Lyon

Maître de Recherches du Service de Santé des Armées

Durant les nombreuses années passées sous ses ordres à la Division de Microbiologie du CRSSA il a été pour nous un guide de tous les instants, cherchant à nous faire partager son souci de précision et de rigueur dans l'expérimentation. Par l'étendue de ses connaissances scientifiques et la richesse de ses qualités humaines, il constitue pour nous un exemple à suivre. Nous sommes particulièrement heureux de le compter aujourd'hui parmi nos juges et nous le prions de bien vouloir trouver ici le modeste témoignage de notre sincère attachement et de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Médecin Commandant R. FONTANGES

Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Grenoble
Spécialiste de Recherches du Service de Santé des Armées
Chef de la Division de Microbiologie du CRSSA

Au cours des années passées à ses côtés à la Division
de Microbiologie du CRSSA nous avons souvent bénéficié
de son aide amicale et de ses conseils.

Nous sommes très heureux de l'avoir aujourd'hui comme
chef de Division et nous le prions de croire à notre
respectueux dévouement.

A nos maîtres de la Faculté mixte de Médecine
et de Pharmacie de Lyon

A nos maîtres et à nos chefs du Service
de Santé des Armées

Au personnel de la Division de Microbiologie
du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées

I N T R O D U C T I O N

A notre arrivée à la Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, le Médecin Commandant COLOBERT, dans le cadre d'études se rapportant aux relations hôte-bactérie, nous avait demandé d'entreprendre l'isolement et la purification du substrat du lysozyme dont il avait démontré la présence dans la paroi ectoplasmique d'Eberthella typhi.

Ce travail devait nous amener à séparer deux constituants différents par leur composition chimique et leurs propriétés biologiques. L'un correspondant à la couche interne de la paroi, contenait un glycopeptide hydrolysable par le lysozyme; tandis que le second, de nature glucido-lipido-proteinique, recouvrait le précédent et n'était pas autre chose que l'endotoxine O complète ou antigène somatique de la bactérie..

L'existence, dans chacune de ces fractions de quantités importantes de lipides devait nous conduire à entreprendre, à partir de 1960, l'étude de la constitution chimique et des propriétés biologiques de ces derniers: le présent travail est consacré exclusivement au constituant phospholipidique principal de l'endotoxine. Nous avons divisé notre exposé en deux parties; la première présente l'essentiel des connaissances actuelles sur les lipides de l'antigène somatique des bactéries à Gram négatif, leur localisation dans la paroi ectoplasmique, les procédés utilisés pour leur isolement, leurs propriétés biologiques. La seconde partie, est consacrée à la présentation de nos recherches personnelles et à leur discussion.

Avant d'entrer dans le détail de nos recherches, nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué à leur réalisation; nous exprimons particulièrement notre gratitude au Docteur Ch. MERIEUX qui a bien voulu mettre à

notre disposition le personnel et les puissants moyens matériels de l'Institut Mérieux, nécessaires à la production des 3,6 kg de corps bactériens, (poids sec), qui représentent la matière première sur laquelle nous avons travaillé.

P R E M I E R E P A R T I E

E T U D E B I B L I O G R A P H I Q U E

LOCALISATION ET ISOLEMENT DES ENDOTOXINES

Place de l'endotoxine dans la paroi ectoplasmique

On admet actuellement d'une façon générale que la paroi ectoplasmique des bactéries à Gram négatif est constituée de deux enveloppes distinctes. La première qu'on appelle "enveloppe interne" ou "enveloppe rigide" ou "sacculé" se trouve en contact avec la membrane cytoplasmique et assure à la bactérie sa forme et sa cohésion, constituant un véritable exosquelette. Du point de vue chimique elle contient essentiellement un polymère de glucosaminopeptide hydrolysable par le lysozyme et l'enzyme des phages. Une "enveloppe externe" non rigide recouvre la précédente, empêchant la lyse de celle-ci par les enzymes spécifiques. Elle est formée d'un complexe glucido-lipido-protéique qui n'est pas autre chose que l'endotoxine complète ou antigène somatique de la bactérie *.

L'usage des techniques d'ombrage et de contraste positif ou négatif a permis d'étudier au microscope électronique l'ultrastructure de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, aussi bien sur des germes entiers que sur des parois ectoplasmiques isolées. La plupart des espèces étudiées jusqu'à présent ont une surface externe constituée d'éléments sphériques ayant entre 80 et 120 Å de diamètre et groupés en hexagones (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Cependant, BISSET (11) a observé des bandes sur un Spirillum, tandis que BLADEN et MERGENHAGEN (12) ont mis en évidence de nombreux éléments en forme de bâtonnets tordus ayant approximativement 700 Å de large à la surface de Veilonella. D'autre part, l'étude des coupes

* L'état actuel des connaissances sur la structure de la paroi ectoplasmique des bactéries a été exposé dans des publications récentes (1, 2, 3).

fines de bactéries à Gram négatif possédant des macromolécules sphériques à leur surface n'a pas permis jusqu'à présent de déceler de telles subunités (I3, I4, I5, I6), sauf dans le cas de Spirillum serpens (I7). Sur ces coupes, la membrane externe apparaît habituellement formée de deux couches très denses séparées par une couche moins dense (I2, I8, I6). KELLENBERGER et RYTER (I8) admettent que la zone de faible densité serait constituée par un polysaccharide tandis que la couche de forte densité serait de nature protéique ou lipoprotéique. Mais il ne s'agit là que d'une hypothèse et CHAPMAN (I6) pense que les couches denses correspondraient à l'accumulation d'une substance opaque aux électrons (peut-être de l'osmium réduit) à moins qu'il ne s'agisse d'une plus grande concentration des molécules de matériel pariétal ou d'un arrangement différent de ces dernières. Il est d'ailleurs peu probable que la microscopie électronique puisse à elle seule résoudre tous les problèmes de structure de la paroi ectoplasmique.

Isolement des endotoxines.

BOIVIN et MESROBEANU (I9, 20, 2I, 22) furent les premiers en 1933 à décrire une méthode générale pour l'extraction des endotoxines à partir des bactéries à Gram négatif. Elle consiste à traiter les germes à froid par une solution d'acide acétique 0,2 N et fournit des extraits fortement et régulièrement antigéniques que les auteurs considérèrent d'abord comme des complexes glucido-lipidiques avant de s'apercevoir qu'ils contenaient également un élément polypeptidique (23). Du point de vue immunologique, ce sont les supports de la fonction antigénique somatique O des bactéries; d'autre part, leur forte toxicité leur a valu d'être appelées endotoxines (24). La méthode de BOIVIN et MESROBEANU peut s'appliquer d'une façon générale aux endotoxines des bactéries en forme "Smooth", mais elle paraît inopérante dans le cas des bactéries en forme "Rough" ou de celles qui possèdent une couche protéique superficielle (25).

Dès 1934 RAISTRICK et TOPLEY (26) firent connaître un autre procédé basé sur la digestion tryptique des bactéries tuées qui conduit à des complexes spécifiques antigéniques et toxiques plus riches en azote

que ceux fournis par l'acide trichloracétique. Cette méthode a été ensuite perfectionnée par FREEMAN et coll. (27, 30) qui ont démontré la nature glucido-lipido-polypeptidique des produits obtenus, l'élément polypeptidique étant plus abondant et l'élément phospholipidique moins abondant que dans les complexes préparés par l'acide trichloracétique.

MILES et PIRIE (31) ont isolé des complexes glucido-lipido-protéiques antigéniques à partir des brucelles en soumettant les bactéries à une autolyse, après un traitement par une solution de phénol à 2 p.100; l'autolysat étant ensuite fractionné par addition de sulfate d'ammonium et purifié par centrifugation différentielle.

En 1937 MORGAN (32) a décrit une nouvelle méthode particulièrement douce pour la préparation des antigènes somatiques. Elle consiste à soumettre les bactéries préalablement desséchées à des extractions répétées par le diéthylène glycol anhydre. Dans des travaux ultérieurs effectués en collaboration avec PARTRIDGE, l'auteur a montré que ces antigènes sont des complexes lipopolysaccharide-protéine-lipide (33, 34, 35). Cette méthode n'est malheureusement pas applicable à toutes les bactéries à Gram négatif. Si elle a pu être utilisée avec succès dans le cas de Shigella dysenteriae (33, 36), Eberthella typhi (37) Shigella flexneri type 2 (38), elle s'est révélée inefficace pour d'autres souches de cette dernière espèce qui ont dû être soumises à une extraction par un mélange à parties égales de pyridine et d'eau (38). Dans le cas de Shigella sonnei, de meilleurs résultats ont été obtenus par l'usage d'une solution aqueuse à 50 p.100 de glycérol ou d'une solution 7 M d'urée (39).

D'autres procédés très simples ont été proposés pour isoler l'antigène somatique des entérobactéries. Ainsi ROBERTS (40) a préconisé une extraction par l'eau chaude à 80-85°C dans le cas des colibacilles. Pour les salmonelles WALKER (41) a utilisé une solution 2,5 M d'urée; tandis que RIBI et coll. (42, 43, 44) se sont servis d'un mélange d'eau et d'éther éthylique. Plus récemment, RAYNAUD et DIGEON ont montré qu'on pouvait traiter celles-ci par une solution hypertonique d'un mélange de chlorure et citrate de sodium (45) ou encore par une solution M/I d'hydroxylamine

à pH 7, à condition d'opérer à + 38°C pendant 1 heure (46). Ces derniers procédés se sont révélés particulièrement efficaces pour extraire l'endotoxine des souches R.

HOMMA et coll. (47) ont isolé l'endotoxine de Pseudomonas aeruginosa par autolyse des germes en présence de toluène, suivie d'une précipitation par la chlorure de zinc et d'une redissolution du précipité par une solution de phosphate disodique. Il convient cependant de noter avec WEIDEL (48) que certains constituants pariétaux peuvent être dégradés au cours de l'autolyse.

Un procédé facile à mettre en oeuvre et d'application très générale a été décrit par PALMER et GERLOUGH en 1940 (49). Il consiste à traiter les bactéries par du phénol aqueux à 80-85 p.100 pour extraire le matériel protéique et à faire suivre cette opération d'un épuisement par l'eau qui dissout le lipopolysaccharide endotoxique O. Celui-ci n'est pas tout à fait pur et contient encore des traces de protéines difficiles à éliminer.

ROBINSON et FLUSSER (50), puis CO TUI et coll. (51) ont pu obtenir une purification plus poussée en soumettant le lipopolysaccharide à des précipitations répétées à l'aide d'une solution concentrée de phénol. Mais c'est finalement à WESTPHAL, LUDERITZ et BISTER (52) que l'on doit le procédé le plus commode d'extraction des lipopolysaccharides. Il consiste en une simple agitation des germes à froid avec des émulsions phénol-eau, suivie d'une centrifugation pour séparer la phase aqueuse qui contient le lipopolysaccharide. C'est à cette technique que nous avons fait appel pour notre travail et nous la décrirons plus loin d'une façon détaillée.

Les mêmes auteurs ont montré également qu'il est possible d'éliminer complètement la fraction protéique à condition d'opérer à chaud (jusqu'à + 65°C) (52, 53). La méthode de WESTPHAL et coll. présente l'avantage d'être applicable aussi bien aux cultures en forme "Rough" qu'à celles qui sont en forme "Smooth" (54) ainsi qu'aux espèces dont l'antigène somatique est recouvert de protéines (23); mais elle donne des préparations généralement souillées par des acides ribonucléiques dont l'élimination

complète est difficile (52, 55). O'NEIL et TODD (56) semblent avoir résolu ce problème en soumettant les bactéries à un traitement par l'acide trichloracétique avant l'extraction par le phénol.

En essayant comparativement diverses techniques de préparation de l'antigène somatique sur Serratia marcescens, Eberthella typhi et Escherichia coli, NOWOTNY et coll. (57) ont démontré l'efficacité d'une extraction à chaud par un mélange équimoléculaire de pyridine et d'acide formique. L'usage d'une solution à 0,5 p.100 de bromure de cétyltriméthylammonium leur a donné également de bons résultats (57). C'est aussi grâce à un détergent, mais de nature anionique (solution de Teepol commercial), que nous avons pu au cours d'un travail précédent, extraire l'endotoxine d'Eberthella typhi (58, 59) à partir des parois préalablement isolées. L'emploi du Teepol ou de desoxycholate de sodium devait permettre ultérieurement à BARTHA (60) d'obtenir un antigène protecteur non toxique à partir de Bordetella pertussis.

RIBI et coll. (61, 62) ont observé que les préparations d'endotoxines contiennent généralement, avant même qu'on en ait fait l'hydrolyse, des quantités importantes d'haptènes correspondants sous forme dépolymérisée. Ces polysaccharides proviennent en réalité du cytoplasme (63) où il se trouvent sous une forme "native" dans une proportion pouvant atteindre 6 p.100 (62, 63). Ces mêmes auteurs pensent que certains peptides qui se trouvent liés aux endotoxines après leur extraction par le phénol pourraient être également d'origine protoplasmique (64). Si l'on veut obtenir des antigènes très purs, on a donc intérêt à utiliser des parois ectoplasmiques préalablement isolées et débarrassées des traces de constituants cytoplasmiques (64).

Purification des endotoxines.

Les extraits obtenus par les méthodes précédentes sont généralement débarrassés des particules en suspension, soit par filtration, soit par centrifugation, avant ou après dialyse contre l'eau. Du fait de leur

poids moléculaire très élevé, il est possible de purifier les endotoxines par ultracentrifugation fractionnée (55, 65, 66, 67). On peut également recourir à la précipitation fractionnée (31, 57, 67), à la chromatographie sur colonne (68), à l'électrophorèse (47), à la filtration sur gel (62). Dans de nombreux cas l'endotoxine des entérobactéries est contaminée par un antigène commun (69, 70). Ce dernier peut être éliminé par une dissolution dans l'éthanol à 85 p.100 (71) ou par une digestion enzymatique sélective à l'aide de filtrats provenant des cultures de Pseudomonas aeruginosa (72).

Rendement des préparations.

La quantité d'endotoxine que peut fournir une bactérie varie très largement en fonction du procédé d'extraction utilisé. Encore faut-il noter que la comparaison des poids obtenus n'est pas très significative du moment que la composition chimique diffère également, particulièrement en ce qui concerne les acides aminés et les lipides. Le choix de la méthode de préparation devra donc être déterminé par le but de l'opération. D'autre part, pour une même espèce bactérienne, le rendement peut aussi être modifié par la nature de la souche et par les conditions de culture. Voici, à titre d'exemple, les résultats obtenus par NOWOTNY et coll.(57) en appliquant diverses méthodes d'extraction à trois espèces différentes, chacune provenant de la même culture (cf. tableau I).

Nature de la liaison entre l'endotoxine et l'enveloppe interne.

L'étude des méthodes d'extraction de l'endotoxine fait apparaître l'extrême facilité avec laquelle celle-ci se détache de la bactérie. Il n'est donc pas étonnant que certains auteurs aient pu mettre en doute son appartenance à la structure pariétale. WILKINSON (73) et SALTON (74) l'avaient d'abord considérée comme étant une microcapsule, c'est à dire une formation étrangère à la paroi ectoplasmique. Mais SALTON (3) devait par la suite abandonner cette conception en se fondant sur les arguments

suivants : à l'inverse de l'antigène somatique, la capsule peut s'enlever facilement sans que la viabilité du germe soit altérée; d'autre part, on ne connaît pas de systèmes enzymatiques capables de dissoudre sélectivement l'endotoxine, alors que de tels systèmes existent pour la capsule.

La fragilité de cette liaison semble confirmée par les photographies de coupes de bactéries à Gram négatif prises au microscope électronique. En effet, celles-ci montrent habituellement que l'endotoxine ne suit pas exactement le contour de la couche rigide de la paroi. Elle n'adhère à cette dernière qu'en certains endroits et s'en écarte ailleurs, pouvant même décrire des circonvolutions (I2, 75, I7). Il reste à déterminer s'il ne s'agit point là d'artefacts provoqués au cours de la microtomie.

Procédé d'extraction	Souche bactérienne		
	<u>Serratia marcescens</u>	<u>Eberthella typhi</u>	<u>Escherichia coli</u>
	BIZIO	O - 90I	K - I2
I	I5	5	3
II	5	6	3
III	29	I3	2I
IV	27	52	30
V	38	36	I3
VI	28	40	I4

Tableau I - Rendement des procédés d'extraction des endotoxines
(d'après NOWOTNY et coll. (57)).

- Les résultats sont exprimés en grammes d'endotoxine pour 100 grammes de bactéries sèches.
- I = acide trichloracétique (I9), II = phénol - eau (52)
III = eau (40), IV = eau - éther éthylique (42),
V = pyridine - acide formique (57), VI = bromure de
cétyltriméthylammonium (57).

Comme le lipopolysaccharide des bactéries à Gram négatif est difficile à extraire en totalité, WHEAT (76) pense que ce constituant se trouverait dans la paroi ectoplasmique à la fois sous une forme libre et sous une forme liée. La majeure partie du lipopolysaccharide, celle qui s'extraît facilement, ne serait liée au saccule que par une liaison physique, liaison hydrogène, liaison ionique ou liaison de Van der Waals. En ce qui concerne la fraction lipopolysaccharidique dont la liaison avec le saccule serait plus solide, on manque de preuves directes pour conclure d'une façon certaine à l'existence d'une liaison de covalence. Toutefois, divers arguments permettent de penser qu'une telle liaison pourrait attacher une partie du lipopolysaccharide au peptide du saccule. En effet, si l'acide mura-mique qui est un constituant exclusif de la mureine * n'a jamais été retrouvé dans les préparations d'antigène somatique, en revanche, l'acide α -diaminopimélique qui n'existe que dans le saccule a été identifié par FROMME et coll. (78) parmi les acides aminés liés au lipopolysaccharide de Salmonella abortus equi. On le retrouve également dans les cires D des myco-bactéries dont la constitution chimique se rapproche de celle des endotoxi-nes des bactéries à Gram négatif (79).

L'étude comparée des vitesses de biosynthèse du mucopeptide et du lipopolysaccharide montre d'autre part, que ceux-ci sont fabriqués simulta-nément (80). On peut donc penser que le lipopolysaccharide est entièrement lié au saccule au cours des premières étapes de la biosynthèse de la paroi ectoplasmique et qu'il en serait décroché dans un second temps par un pro-cessus d'hydrolyse (76).

Propriétés physiques des endotoxines.

Les endotoxines obtenues par ces diverses méthodes se dissolvent dans l'eau, en donnant des solutions opalescentes plus ou moins visqueuses. Certaines préparations se sont révélées homogènes à l'électrophorèse (81, 82, 83, 84). Pour des pH compris entre 8 et 9, elles migrent lentement et

* Le nom de "mureine" ou "saccule" a été donné récemment par WEIDEL et PELZER (77) au mucopolymère en forme de sac qui constitue le véritable squelette de la paroi ectoplasmique.

se comportent comme des anions, ce qui s'expliquerait par le fait qu'ils contiennent des esters phosphoriques (54). D'après OROSZLAN et MORA (85), l'endotoxine de Serratia marcescens contiendrait en effet 80 groupements anioniques pour une unité ayant un poids moléculaire supposé égal à 100.000. Cette particularité explique la grande affinité de ces substances pour les macromolécules cationiques telles que la polymyxine B, la ribonucléase, la protamine et le lysozyme (86).

Le poids moléculaire des endotoxines, déterminé par ultracentrifugation d'une solution aqueuse, a une valeur qui peut varier de un million (31) jusqu'à dix millions (65, 84, 36) et même vingt millions (79). Cependant, dans le cas du lipopolysaccharide extrait d'Escherichia coli, et dont le poids moléculaire est d'environ 20 millions, SCHRAM, WESTPHAL et LUDERITZ (79) ont pu montrer, à l'aide du microscope électronique, que les grandes particules obtenues sont en réalité constituées par des agrégats de particules élémentaires dont le poids moléculaire est de l'ordre de un million. Ces particules élémentaires ont une forme sphérique et, suivant le pH, s'agglomèrent d'une manière réversible en longues chaînes. Ceci expliquerait pourquoi ces substances ne se comportent pas d'une façon homogène à l'ultracentrifugation. La présence de telles subunités sphériques dans le lipopolysaccharide extrait par la méthode au phénol a été confirmée par WEIDEL et coll. (87) dans le cas d'Escherichia coli et par MARTIN et FRANK (4) dans le cas d'un Spirillum. MILNER et coll. (63) ont obtenu à partir de Bordetella pertussis des fibres de longueurs différentes à côté de bâtonnets plus courts, le diamètre de ces éléments variant de 50 à 100 Å. En examinant par les techniques de contraste positif et négatif l'endotoxine d'une Veillonella, BLADEN et MERGENHAGEN (12) ont pu voir des particules ayant l'aspect de disques aplatis et tordus, généralement plus denses au centre qu'à la périphérie. Celles-ci ont un diamètre variant de 250 à 1400 Å.

C H A P I T R E I I

CONSTITUTION CHIMIQUE DES ENDOTOXINES

Pour une même espèce bactérienne, cultivée dans les mêmes conditions, la composition chimique de l'endotoxine varie considérablement suivant les méthodes d'isolement; les différences portant essentiellement sur les acides aminés et les lipides (57, 88, 64). Toutes les endotoxines des bactéries à Gram négatif possédant cependant, à l'état natif, une structure très voisine de celle de la substance type qui est extraite par le diéthylène-glycol anhydre à partir des bacilles dysentérique et typhique (32, 89, 33, 34). Ce sont des complexes lipopolysaccharide-protéine-lipide dont les constituants peuvent être séparés par diverses méthodes. Le chauffage avec de l'acide acétique dilué conduit par exemple à une dissociation en phospholipide B, polysaccharide et lipoprotéine; tandis qu'un fractionnement des solutions alcalines par de l'éthanol permet d'obtenir le lipide B, un lipopolysaccharide et une protéine (33, 96).

En utilisant diverses méthodes d'hydrolyse il est donc possible d'aboutir à plusieurs produits de clivage qui sont les constituants de l'antigène somatique (figure I.). Les proportions respectives de ces derniers sont à peu près les suivantes : 40-60 p.100 de polysaccharide phosphorylé, 5-15 p.100 de phospholipide A, 10 p.100 de phospholipide B (91).

Il serait arbitraire de parler des lipides en faisant abstraction des polysaccharides et des peptides auxquels ils sont liés par des liaisons de covalence pour former des glycopeptidolipides, aussi étudierons nous successivement chacun de ces groupes de composés.

Polysaccharide - Lipide A - Protéine ----- Lipide B.

(Endotoxine complète)

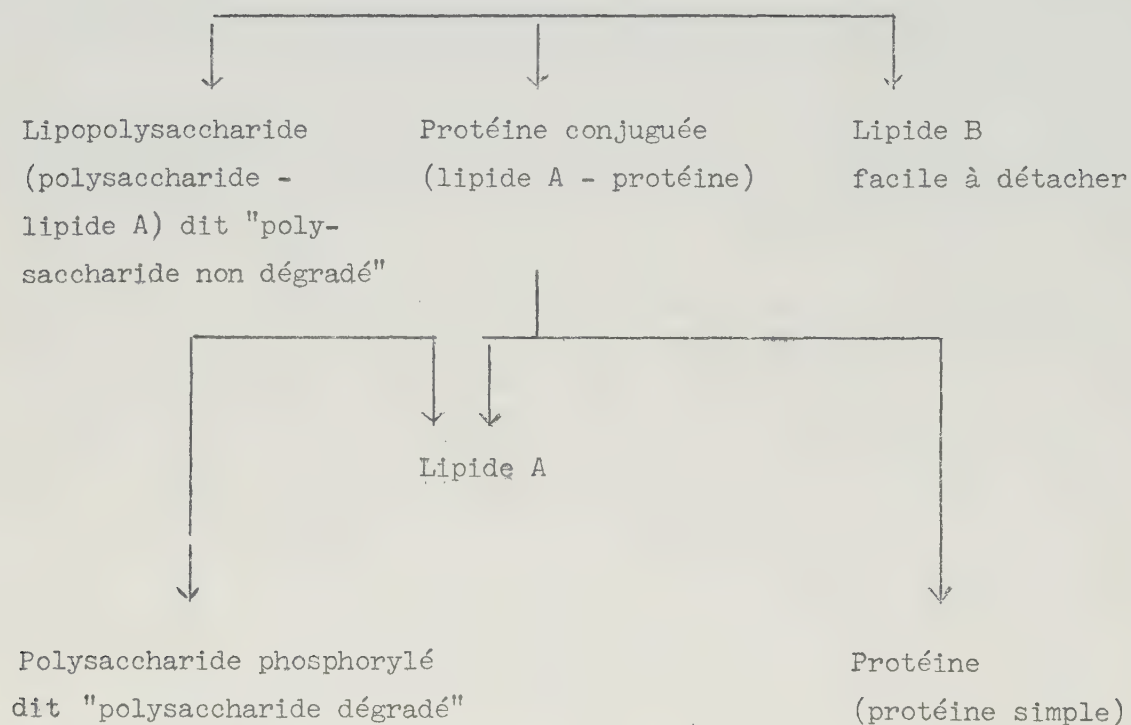


Figure I - Les constituants des endotoxines O des bactéries à Gram négatif, d'après WESTPHAL et LUDERITZ (91).

I - LES CONSTITUANTS GLUCIDIQUES.

Les constituants glucidiques des endotoxines sont des hétéropolysaccharides dont la structure a fait l'objet de nombreux travaux, particulièrement au cours de la dernière décade (voir : 92, 93, 94). Etant donné les faibles quantités de matériel disponible, il a fallu, en effet, attendre les progrès des méthodes chromatographiques pour pouvoir approfondir leur étude chimiques. Celle-ci a été réalisée sur des produits d'origines très différentes : polysaccharides libres des capsules ou des antigènes K (73), antigène somatique O et R dans lesquels le polysaccharide est lié à une protéine et à des lipides (33, 91), haptènes glucidiques obtenus par hydrolyse acide ménagée des antigènes (33) ou des bactéries entières (95, 96, 29, 30). Pour ces derniers, il convient de noter que les polysaccharides peuvent subir des dégradations plus ou moins importantes suivant les conditions d'hydrolyse.

Nature des monosaccharides constitutifs

La diversité des monosaccharides qui ont pu être isolés à partir des endotoxines des bactéries à Gram négatif est très grande. Cependant, il n'existe qu'un petit nombre de glucides différents à l'intérieur d'une même espèce et, parmi ceux-ci, certains se retrouvent dans la plupart des polysaccharides étudiés jusqu'à présent. Les aldohexoses habituellement rencontrés sont au nombre de trois et toujours sous la forme D; D-glucose, D-galactose, D-mannose. Les cétohexoses, en revanche, n'apparaissent que rarement (92). Comme aldopentoses, seuls le D-xylose et le D-arabinose ont été reconnus avec certitude. La présence de D-ribose traduit généralement une souillure par les acides nucléiques; on l'a cependant trouvé comme constituant de certains polysaccharides (97). Parmi les 6-désoxyaldohexoses (méthyl pentoses) seuls le L-rhamnose et le L-fucose ont été identifiés (92).

Les travaux de WESTPHAL (98) ainsi que ceux de PON et STAUB (99) sur les polysaccharides spécifiques des salmonelles ont conduit à la dé-

couverte chez les Enterobacteriaceae d'une nouvelle série de glucides : l'abéquose ou didésoxy-3,6, D-galactose (I00), le paratose ou didésoxy-3,6, D-glucose (I01), le colitose ou didésoxy-3,6, L-galactose (I02) et le tyvélose ou didésoxy-3,6, D-mannose (I00). Ces didésoxy-3,6-aldohexoses sont très rapidement libérés au cours de l'hydrolyse par des acides minéraux dilués, mais, par suite de leur instabilité en milieu acide, leur taux passe par un maximum puis décroît lentement au cours de l'hydrolyse (91). L'intérêt qu'ils ont suscité tant en chimie qu'en immunologie a conduit à de nombreux travaux (cf. 96, I03, I04).

L'existence d'heptoses dans les polysaccharides de certaines bactéries à Gram négatif est connue depuis les travaux de JESAITIS et GOEBEL (78) qui ont caractérisé le D-glycéro-L-mannoheptose dans le polysaccharide de Shigella sonnei. Par la suite, SLEIN et SCHNELL (I05, I06) ont isolé un L-glycéro-D-mannoheptose à partir de Shigella flexneri. Cette même structure a pu être attribuée par WEIDEL (I07) à une heptose que WESTPHAL et coll. (I08) avaient déjà rencontré dans Escherichia coli. D'autres heptoses ont été mis en évidence depuis dans des Chromobactéria (I09, II0, III, II2), Pasteurella (25, II3, II4, II5), Bordetella (II6), Salmonella (78, II7) et Azotobacter (II8). Tous n'ont pas pu être identifiés avec certitude. On sait cependant, qu'il s'agit toujours d'aldoheptoses (92), pouvant exister sous forme phosphorylée (I05, I06) et jouant un rôle important dans l'inactivation de certains phages (78, I07).

La présence d'hexosamines dans les polysaccharides spécifiques des bactéries à Gram négatif ne fait aucun doute, puisqu'on y trouve fréquemment de la glucosamine ou amino-2, désoxy-2, D-glucose et de la galactosamine ou amino-2, désoxy-2, D-galactose, sous forme N-acétylée (92). Cependant, une certaine confusion est née du fait que la N-acétyl-D-glucosamine, constituant habituel du lipide A des endotoxines, peut, dans certains cas, exister dans la partie polysaccharidique. C'est ainsi que, chez les shigelles, on trouve de la glucosamine à la fois dans le lipide A et dans le polyoside, tandis que chez les salmonelles la glucosamine n'existe, le plus souvent, que dans la partie lipidique, le polysaccharide lui-même ne contenant pas d'azote (29). Jusqu'à présent, chaque fois qu'on a trouvé un glucide

aminé autre que le glucosamine dans une endotoxine, on a pu démontrer qu'il faisait partie du polysaccharide. Deux nouveaux sucres aminés ont été isolés à partir du polysaccharide spécifique de Chromobacterium violaceum; il s'agit de la D-fucosamine ou amino-2, didésoxy-2,6, D-galactose (II9) et de la viosamine ou amino-4, didésoxyhexose (I20, I21). D'autres glucides aminés ont pu être obtenus à partir de bactéries à Gram négatif, mais ils ne font pas partie de l'antigène O. C'est le cas, par exemple, des acides aminodésoxy-hexuroniques contenus dans l'antigène Vi des Enterobacteriaceae (I22, I23, I24, I25, I26) et de l'acide muramique, constituant essentiel de la muréine bactérienne (77). Quant aux polymères d'acide sialique qui existent dans certaines souches d'Escherichia coli, il semble actuellement qu'ils appartiennent à des antigènes de nature capsulaire (92, 94).

Récemment HEATH et GHALAMBOR (I27) ont pu isoler à partir d'un lipopolysaccharide provenant de la paroi ectoplasmique d'Escherichia coli O III-B4 un nouveau constituant glucidique qui s'est révélé identique au céto-2, désoxy-3 octonate (KDO des anglo-saxons) déjà connu depuis les travaux de LEVIN et RACKER (I42) mais dont la conformation stérique n'a pas encore été établie. OSBORN (I29) a démontré que le même glucide existait dans la paroi d'un mutant de Salmonella typhi murium. Tous ces résultats permettent de penser que la liste des monosaccharides bactériens n'est pas encore close.

Structure des polysaccharides.

C'est aux progrès de l'immunochimie que l'on doit les premiers éclaircissements sur la séquence des divers monosaccharides dans les endotoxines bactériennes. Grâce aux techniques d'inhibition spécifique et de précipitation croisée Melle STAUB, WESTPHAL, LUDERITZ, KAUFMANN, ROBBINS, UCHIDA et leurs collaborateurs (96, 94, I30 - I40) ont pu, en effet, établir l'identité et la nature des liaisons des monosaccharides ou des oligosaccharides terminaux responsables des différents facteurs O du schéma de

KAUFMANN-WHITE. Il ressort particulièrement de ces travaux que les 3-6 didésoxyhexoses se situent toujours à l'extrémité d'une chaîne. Les informations apportées par ces méthodes se limitent malheureusement aux séquences terminales; car les monosaccharides intra moléculaires, qui se trouvent masqués, ne peuvent pas intervenir dans les mécanismes mis en jeu.

L'étude comparative des polysaccharides spécifiques de certaines bactéries et de leurs mutants génétiques respectifs a permis de vaincre ces difficultés, tout en apportant les premiers renseignements sur la biosynthèse des endotoxines. Les résultats des analyses des lipopolysaccharides des formes S et R des entérobactéries montrent, en effet, qu'il existe généralement chez les formes S un heptose, une hexosamine, du galactose, du glucose, du mannose, du rhamnose et un didésoxyhexose tandis que chez les formes R on ne retrouve habituellement que les quatre premiers de ces sucres (I41, I43). Tout se passe donc comme s'il existait chez les deux formes un tronc commun sur lequel viendraient se greffer des monosaccharides supplémentaires - en particulier les désoxyglucides - dans le cas des formes S. Cette notion de structure fondamentale commune vient d'être confirmée d'une manière éclatante. En sélectionnant et en étudiant des souches de salmonelles déficientes en uridine diphosphogalactose - 4 - épimérase, NIKAIDO, FUKUSAWA et coll. (I44, I52) ont montré que les polysaccharides spécifiques de celles-ci ne contiennent que du glucose et un heptose phosphorylé. En effet, le galactose, ne pouvant être synthétisé, disparaît de la paroi et avec lui tous les autres monosaccharides qui s'y rattachent normalement. Ces derniers s'accumulent dans le cytoplasme sous forme de nucléotides. Si l'on introduit du galactose dans le milieu de culture, ce sucre est transféré dans la paroi ectoplasmique et le polysaccharide retrouve rapidement la composition de celui de la souche sauvage. Partant de ces résultats, OSBORN, HORECKER, ROSEN, ROTHFIELD et coll. (I17, I53 - I56) ont pu apporter de nouvelles précisions sur la structure des polysaccharides des antigènes O. Ces auteurs ont, en effet, isolé un mutant de Salmonella typhi murium déficient en phosphoglucose isomérase dont le polysaccharide spécifique n'est constitué que d'heptose-phosphate et de KDO; celui-ci ayant été découvert entre temps par HEATH et GHALAMBOR (I27). OSBORN et coll. (I28) ont réussi à rattacher par biosynthèse, sur la chaîne heptose-phosphate, successivement du glucose,

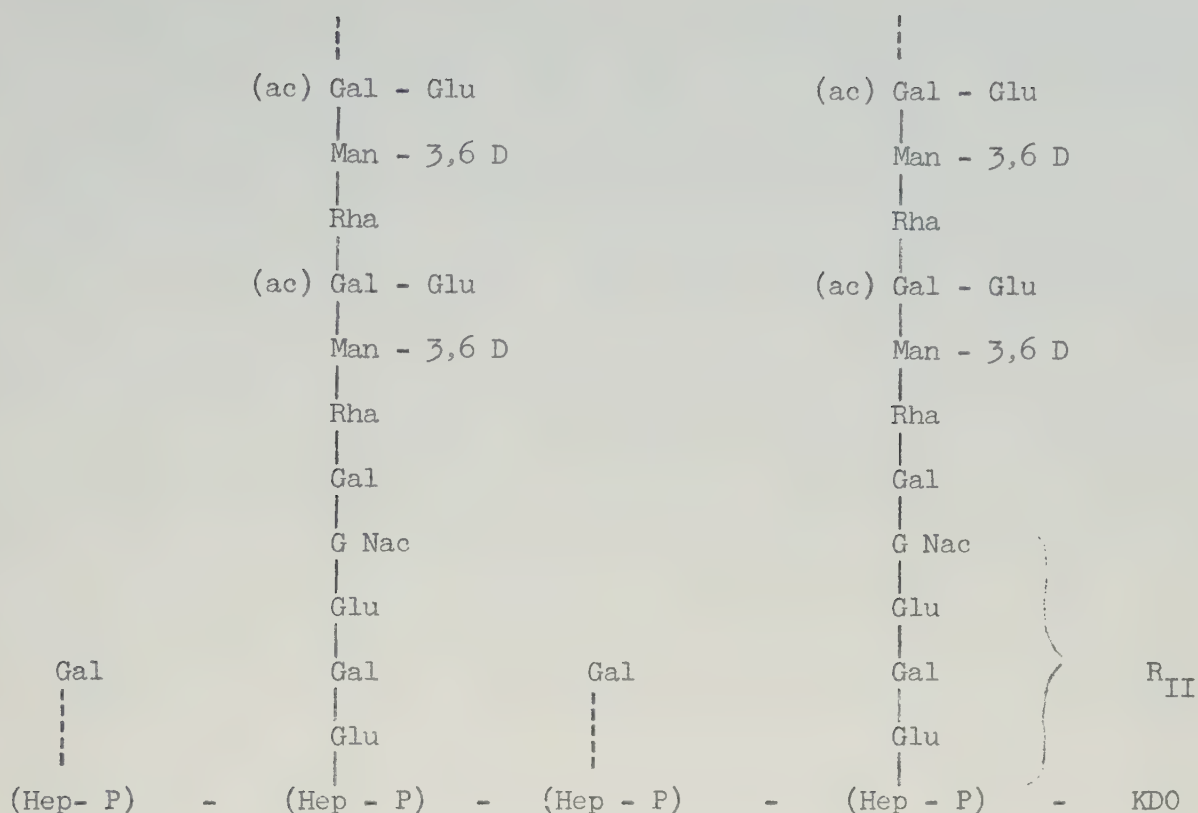


Figure 2 - Formules possibles des polyosides des Salmonella des groupes B et D (d'après STAUB et WESTPHAL (94)).

Gal = Galactose; Glu = Glucose; Man = Mannose; Rha = Rhamnose; GNac = N-acétyl glucosamine; Hep - P = Heptose-phosphate; KDO = céto-désoxyoctonate; ac = acétyl.

B : 3,6 D = Abequose

D : 3,6 D = Tycélose

Selon SUTHERLAND et coll. (158) la chaîne R_{II} contiendrait également un galactose fixé en 6 sur le glucose.

du galactose et de la glucosamine, reconstituant ainsi la souche R de l'espèce.

Grâce à tous ces travaux il est possible, actuellement, de donner une formule assez précise pour les polyosides S de certains groupes de Salmonella (figure 2) (cf. I23, I52, 94). Il est probable cependant qu'il faudra y ajouter quelques compléments, car, au fur et à mesure que ces structures sont élucidées la découverte de constituants nouveaux relance le problème. Ainsi GROLLMAN et OSBORN (I57) ont démontré récemment que l'éthanolamine est aussi un constituant fondamental du polysaccharide où elle se trouverait rattachée à l'heptose par une liaison phosphodiester.

D'après ANACKER et coll. (62), il est peu probable que l'heptose-phosphate constitue une longue épine dorsale. Ces auteurs pensent, en effet, que les travaux de ROBBINS et USHIDA (I32), ceux de RIBI et coll. (I59) et ceux de NIKAIDO (I52) viendraient plutôt appuyer l'hypothèse de l'existence de tronçons communs très courts répartis entre les longues chaînes polysaccharidiques qui confèrent à l'endotoxine sa structure micellaire. Ils considèrent d'autre part que la glucosamine doit être rattachée en grande partie au polysaccharide plutôt qu'au lipide A et qu'elle serait donc également un constituant essentiel du squelette glucidique. Compte tenu de ce que nous savons sur la répartition de la glucosamine dans l'endotoxine, il convient d'accueillir cette conception avec prudence, d'autant plus que WESTPHAL (I60) soupçonne le procédé utilisé par les auteurs précédents pour extraire l'antigène somatique (mélange eau-éther éthylique) d'activer des systèmes enzymatiques capables de libérer une partie des acides gras du lipide A.

Un autre point important n'a pas été encore élucidé d'une façon définitive; il s'agit de la nature de la liaison entre le polysaccharide et la lipide A. Se fondant sur des arguments indirects, OSBORN (I29) pense que ce dernier serait lié au céto-désoxyoctonate par une liaison osidique. En effet, si l'on sépare le lipide A du polysaccharide par hydrolyse acide ménagée, la seule fonction réductrice terminale apparaissant sur la chaîne polysidique est rattachée au KDO. D'autre part, la labilité de la liaison polysaccharide-lipide correspond à celle des liaisons osidiques du KDO. Un

argument supplémentaire en faveur de cette hypothèse a pu être apporté récemment par EDSTROM et HEATH (161). Ceux-ci ont réussi à transférer, par voie enzymatique, du KDO sur du lipide A isolé.

II - LES CONSTITUANTS PROTEIQUES.

MORGAN et PARTRIDGE (34) ont été les premiers à démontrer que le constituant protéique de l'endotoxine n'était pas, comme on l'avait souvent dit, une substance de nature polypeptidique, mais une véritable protéine conjuguée. Toutefois il convient de noter que la plupart des techniques d'extraction de l'antigène somatique dénaturent ou éliminent, au moins partiellement, cette fraction. Il n'est donc pas étonnant que son importance ait été minimisée (162, 163, 164). Il a fallu la découverte récente de son rôle dans la pathogénicité de certaines bactéries pour qu'on approfondisse son étude et qu'on remette en lumière des travaux plus anciens.

Dès 1925, VINCENT (165) avait constaté l'existence chez le colibacille, de deux toxines différentes. L'une, thermolabile et décelable dans le milieu de culture entre la 23^{ème} heure et le cinquième jour, fut considérée par lui comme étant une exotoxine neurotrope; tandis que la seconde, thermostable et n'apparaissant dans le milieu qu'entre le 15^{ème} et le 20^{ème} jour, était une endotoxine entérotrope. BOIVIN et MESROBEANU (166, 172) devaient montrer qu'on pouvait également obtenir une endotoxine O thermostable et une neurotoxine thermolabile à partir d'une variante S du bacille de Shiga. De telles neurotoxines furent ensuite isolées par DIGEON et RAYNAUD (46, 173) à partir d'un bacille typhique, puis par GRABAR et GALLUT (174, 175), FRETER (176), JENKIN et ROWLEY (177) à partir des vibrions cholériques. Ces deux derniers auteurs, se basant sur des arguments d'ordre immunologique, affirmèrent même que ces protéines devaient faire partie de l'antigène de BOIVIN. L'isolement d'une protéine toxique à partir de l'endotoxine O de Shigella flexneri par BINKLEY, GOEBEL et PERLMAN (90) venait appuyer cette hypothèse. Mais BOROFF et MACRI (178, 179) furent les premiers à démontrer, par des méthodes immunologiques, qu'il n'existe dans cette

bactérie que l'endotoxine O de nature glucido-lipido-polypeptidique, la neurotoxine n'étant pas autre chose que la fraction protéique, laquelle peut être libérée du complexe par des processus d'autolyse microbienne. La possibilité d'une libération de la neurotoxine Shiga à partir de l'antigène somatique, par voie enzymatique, a été également envisagée par VAN HEYNINGEN (180).

Poursuivant leurs recherches sur les endotoxines thermolabiles des bactéries à Gram négatif, I. MESROBEANU, L. MESROBEANU et coll. (181, 183) ont pu isoler et étudier celles-ci chez des Salmonella, Shigella, Escherichia, Proteus, et Serratia. Il ont montré que les endotoxines obtenues par autolyse des shigelles sont, en fait, des "lipoprotéines" contenant 16-22 p.100 de lipide, 12-13 p.100 d'azote total et 3-5 p.100 de substances réductrices après hydrolyse. Le taux de lipide diminue au cours du vieillissement de la toxine sans que la toxicité de cette dernière varie d'une manière significative. Toutefois, l'élimination complète de la fraction lipidique, par voie chimique, s'accompagne d'une disparition de la toxicité (184). La fraction hydrosoluble obtenue après hydrolyse acide de ces neurotoxines contient 17 acides aminés différents, ainsi que de la glucosamine. D'autre part, celles-ci sont antigéniques tout comme les lipoprotéines isolées directement à partir de l'endotoxine O complète. Elles diffèrent cependant de ces dernières par la présence de leucine et par une teneur plus faible en glucosamine (184). Pour une même espèce bactérienne les neurotoxines provenant de souches différentes n'ont pas la même spécificité antigénique; mais elles peuvent donner des réactions sérologiques croisées. De plus, il n'existe pas de relations sérologiques entre des neurotoxines provenant des variantes S et R d'une même souche, ce qui implique nécessairement une variation de la spécificité de la protéine, bien qu'on n'ait observé aucun changement dans la composition en acides aminés de cette dernière (185).

Parallèlement, l'étude chimique et immunologique de certaines bactériocines produites par des bactéries à Gram négatif *, particulièrement celle de la colicine K d'Escherichia coli (I90-I92) et de la pyocine de Pseudomonas aeruginosa (I95 -I97), a révélé que, dans la plupart des cas, ces substances s'identifient également à la protéine de l'antigène somatique complet. Cette protéine a été plus spécialement étudiée chez Pseudomonas aeruginosa par HOMMA et coll. (I95 -I97) qui l'ont isolée, d'une part, à partir des parois ectoplasmiques préalablement soumises à l'action de lysozyme et, d'autre part, à partir de l'endotoxine complète. Les deux fractions protéiques ainsi obtenues se sont révélées homogènes à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation. La constante de sédimentation est égale à I,75 pour la première et à I,I5 pour la seconde. Elles contiennent du phosphore et de la galactosamine en quantités différentes; mais aussi I8 acides aminés identiques en proportions très voisines. Elles ont, d'autre part, les mêmes propriétés biologiques et possèdent, en particulier, un antigène spécifique commun qui existe également dans l'endotoxine complète. Les sérums de lapins immunisés avec ces protéines agglutinent légèrement les germes entiers, ce qui semble indiquer que la fraction protéique de l'endotoxine se trouve à la surface de la paroi.

Ce qu'il importe surtout de noter, c'est la diversité des acides aminés contenus dans ces protéines; car ceci est une caractéristique de la paroi ectoplasmique des bactéries à Gram négatif. On sait, en effet, que la paroi ectoplasmique des bactéries à Gram positif n'en contient qu'une série limitée, les acides aminés aromatiques, les acides aminés soufrés, la proline, l'histidine et l'arginine ne s'y trouvant jamais (3). On a constaté par

* Parmi les bactéries d'une même espèce, seules quelques souches peuvent produire des bactériocines, antibiotiques de nature protéique agissant uniquement sur certaines espèces identiques ou voisines (cf.I86,I87,I88). On a pu démontrer, dans le cas d'Escherichia coli, que la synthèse des différentes colicines, est induite par des facteurs colicinogènes qui sont des déterminants génétiques indépendants du chromosome et pouvant être transférés d'une cellule à l'autre par conjugaison bactérienne ou par transduction à l'aide d'un phage (I89).

ailleurs que, chez les bactéries à Gram négatif, les acides aminés du glycopeptide fondamental sont peu nombreux par rapport à ceux de la paroi ectoplasmique entière (198, 202). Ceci implique nécessairement une plus grande diversité au niveau de l'endotoxine. Cependant, l'acide diaminopimélique de même que les isomères D des acides aminés semblent localisés exclusivement dans la muréine.

Les travaux de SALTON et coll. (203, 204), en vue d'identifier les acides aminés N-terminaux et C-terminaux des parois de certaines bactéries à Gram négatif ont conduit à des résultats difficiles à interpréter. Dans l'état actuel des connaissances, on ne saurait dire, en effet, si ces acides aminés appartiennent à l'enveloppe rigide ou à l'antigène somatique.

III - LES CONSTITUANTS LIPIDIQUES.

Les lipides non liés

La paroi ectoplasmique des bactéries à Gram négatif contient des quantités importantes de lipides non liés, constitués principalement d'hydrocarbures, de glycérides, de phosphatides et de glycolipides (205). Mais, du fait de l'utilisation de certains solvants organiques comme l'éthanol et l'acétone au cours des phases ultimes de la préparation des endotoxines, on ne retrouve pas, en général, de tels lipides dans ces dernières. Cependant, MORGAN et PARTRIDGE (33) ont pu obtenir une fraction lipidique correspondant à 0,8 p.100 du matériel antigénique, en traitant l'antigène somatique complet de Shigella dysenteriae successivement par de l'éther éthylique, un mélange alcool-éther, et du chloroforme. MILES et PIRIE (31) ont constaté d'autre part, qu'une petite quantité de lipide pouvait être extraite de l'endotoxine complète de Brucella melitensis par des solvants comme le chloroforme et l'éther, mais qu'il était nécessaire d'utiliser un mélange à parties égales d'alcool et d'éther contenant 0,5 p.100 d'acide chlorhydrique concentré pour réaliser une extraction totale. On obtient ainsi un mélange de lipide non phosphorés et de lipides contenant à la fois du phosphore et de l'azote. Aucune étude analytique n'en a été faite. L'extraction

directe par l'éther au Kumagawa a permis à CREACH, ENTRESANGLES et COLOBERT (88) de recueillir environ 5 p.100 de lipides à partir de l'endotoxine d'Eberthella typhi, obtenue en traitant par un détergent anionique les parois ectoplasmiques préalablement isolées. Ces lipides contenaient principalement des acides gras libres et des glycérides. Les mêmes auteurs ont constaté qu'on pouvait également retirer des petites quantités d'acides gras libres du lipopolysaccharide préparé par la méthode de WESTPHAL, à condition d'utiliser un mélange chloroforme-méthanol à froid ou, de préférence, une série de solvants à chaud.

MORGAN et PARTRIDGE (33) ont montré qu'il était possible d'extraire par l'éther 9 à 12 p.100 de lipides à partir de l'endotoxine de Shigella dysenteriae, à condition que celle-ci ait été préalablement soumise à une hydrolyse par l'acide acétique 0,1 N, au bain-marie bouillant, pendant 4 heures. La fraction lipidique ainsi obtenue contient 11 p.100 d'acides gras libres et un phospholipide dont les teneurs en azote et phosphore sont respectivement égales à 1, 8 et 3,9 p.100, ce qui donne un rapport P/N sensiblement égal à 1. Partant de cette caractéristique et en tenant compte, d'autre part, des propriétés de solubilité, ces auteurs avaient conclu que ce phospholipide pouvait être une céphaline. L'analyse qualitative a montré qu'il contient de l'acide glycérophosphorique et, comme seuls acides organiques, les acides plasmique et oléique, tandis que la base azotée n'a pu être identifiée. En fait, l'hydrolyse acide n'est pas indispensable pour libérer ce phospholipide, puisqu'il reste soluble après dissolution de l'antigène somatique dans le formamide neutre et anhydre suivie d'une réprecipitation de ce dernier par l'éthanol (33). On a pu constater, d'autre part, qu'il était éliminé de l'endotoxine par un simple traitement au phénol (34).

BINKLEY et coll. (90) ont retrouvé dans l'endotoxine de Shigella flexneri environ 5 p.100 de phospholipide extractible par l'éther, après un traitement ménagé à l'éthanol en milieu alcalin. En revanche, ils n'ont obtenu aucun fractionnement de l'antigène en réprecipitant ce dernier par l'alcool à partir d'une solution dans le formamide. Ils ont même noté avec intérêt que la teneur en lipide n'est pas modifiée après une telle opération.

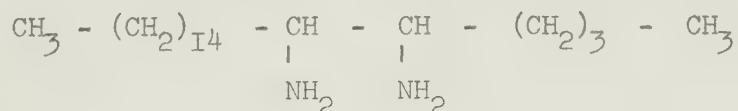
WESTPHAL et LUDERITZ (91) ont donné le nom de lipide B au phospholipide faiblement lié de l'endotoxine, pour le distinguer du lipide A dont la liaison avec la fraction polysaccharidique est extrêmement solide. WESTPHAL (134) pense d'ailleurs que le lipide B ne fait pas réellement partie de l'antigène somatique, mais serait simplement adsorbé sur sa surface. Contrairement au lipide A, le lipide B n'est pas toxique pour les animaux supérieurs et, jusqu'à présent, on ne lui a découvert aucune propriété biologique intéressante (91). Cette absence d'activité jointe au fait qu'il s'élimine facilement au cours de la purification des endotoxines expliquent sans doute le peu d'intérêt qu'il a suscité. On ne connaît, en effet, pratiquement rien de sa structure et il n'est pas certain, d'autre part, que la fraction lipidique obtenue soit la même suivant qu'on l'extrait directement par le formamide ou qu'on utilise l'éther après hydrolyse ménagée. Seul le lipide B extrait d'un lipopolysaccharide d'Escherichia coli a été étudié sérieusement par KUROKAWA et coll. (206). Il représente 7,2 p.100 du complexe antigénique et a pu être séparé en deux fractions dont l'une, soluble dans l'éther et l'éthanol, contient 7,0 p.100 d'éthanolamine et 1,5 p.100 de sérine, tandis que l'autre, soluble dans l'éther mais insoluble dans l'éthanol contient 2,0 p.100 d'éthanolamine et 4, 6 p.100 de sérine. Il n'existe pas de choline dans ces fractions.

Plus récemment RIBI et coll. (207, 164) ont utilisé divers procédés non hydrolytiques pour extraire les lipides d'une endotoxine obtenue à partir de Salmonella enteritidis par le procédé eau-éther. L'ébullition sous reflux dans un mélange de chloroforme et de méthanol leur a donné une fraction lipidique soluble dans le chloroforme, représentant 3,9 p.100 du matériel initial et ne possédant pas de propriétés biologiques. En soumettant le résidu à une nouvelle ébullition sous reflux dans un mélange de monochlorobenzène et d'éthanol, ils ont pu extraire ensuite une autre fraction lipidique représentant 1,8 p.100 de l'endotoxine et possédant une toxicité et une pyogénicité non négligeables. Toutefois, à notre connaissance, aucune étude n'a été consacrée à la composition chimique de ces fractions.

Les lipides liés (Lipide A).

Déjà en 1933 BOIVIN, MESROBEANU et MESROBEANU (22) avaient décrit leur endotoxine comme étant un "glycolipide" et montré qu'après hydrolyse acétique ménagée ce dernier se scindait pour donner un précipité de nature lipidique, appelé "fraction A", et un constituant soluble en milieu acide, appelé "fraction B". De tels phospholipides liés aux polysaccharides devaient être ensuite isolés par de nombreux auteurs à partir de diverses espèces à Gram négatif (cf. tableau 2). Cependant les procédés utilisés, tant pour l'extraction des endotoxines que pour leur clivage en polysaccharide et phospholipide azoté sont souvent différents d'une publication à l'autre (cf. tableau 3). Or, NOWOTNY (222) a démontré que, pour une même espèce bactérienne, le rendement et la composition chimique des lipides obtenus varient largement en fonction des méthodes utilisées (cf. tableau 4).

Composition chimique du lipide A. IKAWA et coll. (225, 215, 226) ont été les premiers à étudier en détail la composition chimique du phospholipide isolé à partir d'un lipopolysaccharide d'Escherichia coli. Après avoir soumis cette fraction lipidique à une hydrolyse dans l'acide chlorhydrique 5 N à + 100°C pendant 15 heures, ils ont extrait les acides gras par l'éther, tandis que les constituants azotés sont restés dans la phase aqueuse. Les acides gras contenus dans la phase éthérée sont les acides laurique, myristique, palmitique et D (-) β hydroxymyristique (215). La chromatographie sur papier des produits hydrosolubles a permis d'identifier la D-glucosamine, l'éthanolamine, les acides phosphorique et aspartique, enfin la nécrosamine ou diamino-4,5, N-eicosane dont la structure est la suivante :



Cette substance a pu être cristallisée à l'état de chlorhydrate, de picrate et de dithiocarbamate (226). Il s'agirait du premier dérivé diaminé d'hydrocarbure aliphatique à longue chaîne que l'on ait rencontré jusqu'à présent à l'état naturel. En fait, les résultats obtenus plus récemment par BURTON et CARTER (67) paraissent remettre en question l'existence de la nécrosamine

Espèce bactérienne	% de lipide A dans le lipopoly- saccharide	pF°C	C %	H %	N %	P %	Hexosa- mine %	Auteurs
<i>Chromobacterium violaceum</i>	I8	I79-I83						DAVIES et coll.(208)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>								KASAI et coll. (209)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50				3,4	3,3		HOMMA (47)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	28,4							TAUBER et GARSON (210)
<i>Neisseria meningitidis</i>	I2,5							MERGENHAGEN et coll.(211)
<i>Pasteurella pestis</i>	50				I,7	2,2		DAVIES et coll.(208,25)
<i>Pasteurella tularensis</i>	9,0							ORMSBEE et LARSON (212)
<i>Brucella melitensis</i>	20-26		60-62	9,4-10	4,3-4,6	I,4-I,6		MILES et PIRIE (213)
<i>Bordetella bronchisepticus</i>	25							MAC LENNAN (214)
<i>Escherichia coli</i>	24	I75-I80	57,3	10,1	3,3	I,6	I2	IKAWA et coll.(215)
<i>Escherichia coli</i>	I4	I70-I73			2,20	I,9	I6-20	KASAI et coll.(209)
<i>E. coli</i> OIII-B4		I80-I82	61,1	9,5	2,7	I,9	I9	NETTER et coll.(216)
<i>E. coli</i> O8 (Kröger)	I3	I95-6	61,1	9,4	I,9	2,3	I7,8	WESTPHAL et coll.(55)
<i>Serratia marcescens</i>	I6				I,9	I,1		HARTWELL et SHEAR (84)
<i>Salmonella paratyphi</i> B	I7	I95-200			2,19	2,6		KASAI et coll.(217,209)
<i>S. abortus equi</i>	26	I92-I96	62,3	9,4	I,6	2,0	I7,9	FROMME et coll. (78)
<i>Eberthella typhi</i>	20-30							WEBSTER et coll.(162)
<i>Shigella dysenteriae</i>	7							DAVIES (218)
<i>Shigella flexneri</i>	I0		63,3	9,5	2,7	3,3		TAL et GOEBEL (219)
<i>Shigella flexneri</i>	9	I77-I79			2,21	2,3		KASAI et coll. (209)
<i>Shigella sonnei</i>	29				I,4	I,3		JESAITIS et GOEBEL(82)
<i>Shigella flexneri</i>	25					0		JOHNSON (220)

Souche	Extraction de l'endotoxine	Libération des lipides	Références
Salmonella enteritidis	Acide trichloracétique (0,25 N)	Acide acétique (0,2 N)	BOIVIN et MESROBEAU, 1933(22)
Salm. typhimurium	Autolyse ds phénol 2p.100	Acide chlorhydrique(0,IN)	MILES et PIRIE, 1939 (31)
Brucella melitensis	Diéthylène glycol	Acide acétique(0,I N)	MORGAN et PARTRIDGE, 1940(33)
Shigella dysenteriae	Acide acétique (0,I N)	Acide acétique (0,I N)	FREEMAN, 1943 (30)
Salmonella typhimur.	Diéthylène glycol ou pyridine à 50 p.100	Solution saturée d'acide picrique	GOEBEL et coll., 1945 (38)
Shigella paradysenter.	Acide trichloracétique(0,IN)	Acide acétique glacial	BENDICH et CHARGAFF, 1949(22I)
Proteus OX - I9	Phénol - eau	Acide chlorhydrique(IN)	WESTPHAL et LUDERITZ, 1954 (9I)
Salmonella abortus equi	Solution de Teepol	Acide chlorhydrique (IN)	COLOBERT et CREACH, 1960 (59)
Escherichia coli	Eau - éther	Acide acétique (0,I N)	RIBI et coll., 196I (207)
Eberthella typhi	Acide trichloracétique 5 %	Acide formique (0,I N)	NOWOTNY, 1963 (222)
Salmonella enteritidis	Phénol - eau	Acide sulfurique (I N)	MERGENHAGEN et coll., 1963(2II)
Serratia marcescens	Phénol - eau	Acide acétique (I N)	MERGENHAGEN et coll., 1963(223)
Neisseria meningitidis	Eau bouillante	Acide chlorhydrique(IN)	FOLKERS, 1963 (224)
Neisseria meningitidis			
Escherichia coli			

Tableau 3. Méthodes utilisées pour libérer le lipide lié des endotoxines (cf.NOWOTNY (222)).

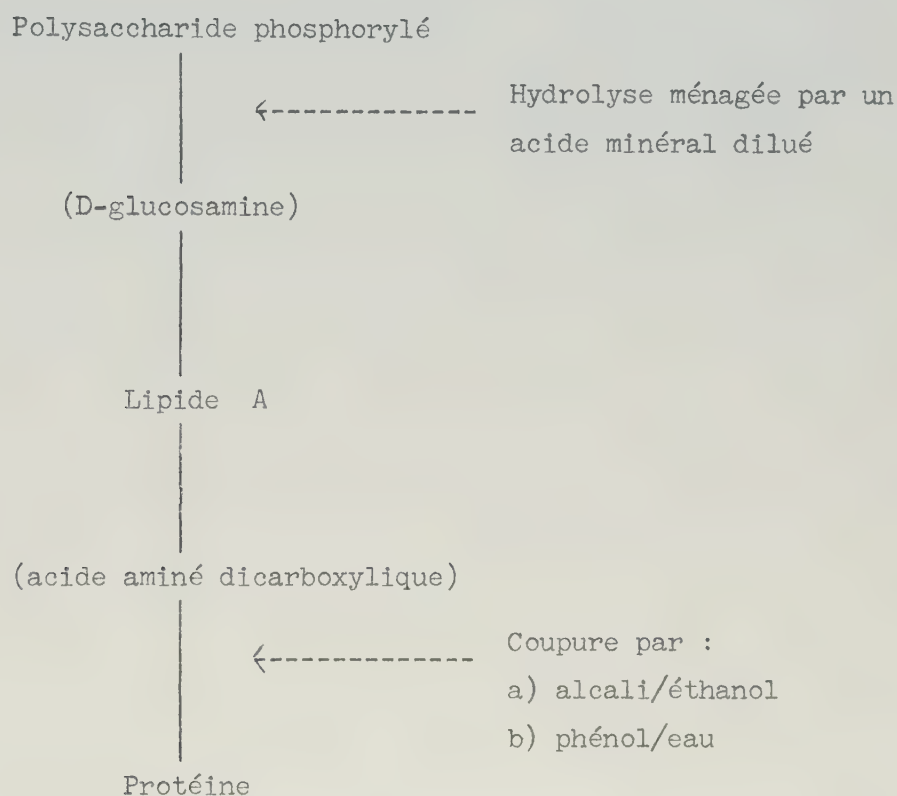
Hydrolyse	Lipide brut obtenu	Analyse des lipides bruts			
		Acides gras libres	Fraction soluble dans pyridine	Fraction insoluble dans pyridine	Glucides dosés par l'anthro- ne
	%	%	%	%	%
Acide acétique (0,2N) 30 mn	33	12	25	63	7,8
HCl (0,1N), 120mn	11	46	16	38	4,8
HCl (1,0N), 30mn	21	39	33	28	3,1
Acide formique (0,1N), 30mn	30	14	53	33	3,6

Tableau 4 - Comparaison des mélanges lipidiques bruts obtenus en hydrolysant par des procédés différents une endotoxine extraite de Serratia marcescens par la méthode de BOIVIN. (cf. NOWOTNY (222)).

dans les endotoxines. A côté de ces différentes substances, il en existe d'autres qui n'ont pas pu être identifiées. Certaines d'entre elles réagissent avec la ninhydrine tandis que d'autres réduisent le nitrate d'argent.

WESTPHAL et coll. (78, 227, 91, 228, 229, 55) ont étudié à leur tour le phospholipide isolé à partir des lipopolysaccharides d'Escherichia coli (Kröger) et de Salmonella abortus equi. Ils ont donné à ce constituant le nom de lipide A. L'usage de la chromatographie sur papier et de l'électrophorèse sur papier, sous haute tension, leur a permis de retrouver les mêmes constituants azotés que IKAWA et coll. et de déceler en outre la présence d'acide glutamique. D'autre part, ils ont pu mettre en évidence l'existence de glycérol dans le lipide A des deux espèces. WESTPHAL et

LUDERITZ (9I) pensent que dans l'endotoxine le lipide A serait lié d'une part à la fraction polysaccharidique par l'intermédiaire de la glucosamine et d'autre part à la fraction protéique par l'intermédiaire d'un acide aminé dicarboxylique (acide aspartique ou glutamique), selon le schéma suivant :



En fait, le lipide A brut qu'on obtient par hydrolyse acide ménagée des lipopolysaccharides est une substance hétérogène contenant des acides gras libres, plusieurs fractions phospholipidiques, des glyco et des lipoprotéines (222). Diverses techniques ont été proposées pour la purification du principal constituant lipidique. Certaines font intervenir des séries de dissolutions fractionnées suivies de reprecipitations dans les solvants organiques (230, 209). D'autres font appel aux méthodes de chromatographie sur colonne de diatomées (23I) ou d'acide silicique (209, 67, 232, 222). Cependant, il ne semble pas qu'on ait réussi, jusqu'à présent, à isoler une fraction véritablement homogène. NOWOTNY (222) a, en effet, constaté que des pics séparés sur colonne d'acide silicique donnent plusieurs

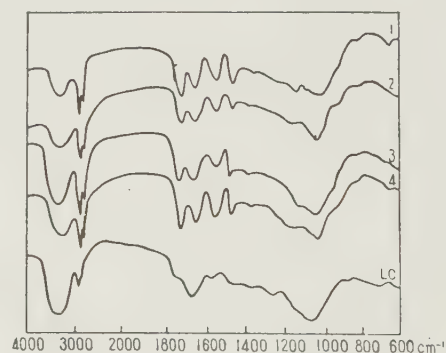
taches en chromatographie sur papier silicé. Inversement, KASAI et coll. (209) ont observé six pics en chromatographie sur colonne pour une préparation qui ne donnait que deux taches en chromatographie sur papier. Ces résultats sont d'ailleurs difficilement comparables, les techniques utilisées n'étant pas les mêmes.

Récemment KASAI et YAMANO (233) ont appliqué la chromatographie sur couche mince d'acide silicique à l'étude de l'homogénéité du lipide A de quatre espèces bactériennes différentes. Ils ont montré que les chromatogrammes de ces lipides A présentent une similitude remarquable et révèlent la présence d'au moins huit constituants lipidiques différents. D'autre part, les proportions relatives de ces derniers varient suivant les espèces étudiées et, pour une même espèce, suivant le lot de lipide A utilisé.

Propriétés physiques du lipide A. Le lipide A se présente sous forme d'un solide de consistance cireuse et de couleur ambrée ou brun clair. Il est insoluble dans l'eau, l'acétone, l'éthanol et le méthanol, peu soluble dans l'éther et le benzène, soluble dans le chloroforme, le diméthylformamide et surtout, la pyridine. Il fond vers 170-180°C avec décomposition.

Figure 3. Spectres I.R. de
différents lipides A.
(d'après KASAI et coll.(209))

- (1) E. coli, (2) Sh. flexneri
(3) S. paratyphi, (4) Ps. fluorescens
(LC) Lipopolysaccharide de E. coli.



Les spectres infrarouges des lipides A provenant d'espèces bactériennes différentes présentent une similitude remarquable, ce qui traduit une analogie de la structure chimique de ces fractions (209, 67). Cependant, ils diffèrent très nettement de ceux des lipopolysaccharides correspondants. Les principaux pics d'absorption se situent vers $1735-1725\text{ cm}^{-1}$ ($5,76-5,80\text{ }\mu$), $1660-1650\text{ cm}^{-1}$ ($6,02-6,06\text{ }\mu$) et $1550-1540\text{ cm}^{-1}$ ($6,45-6,49\text{ }\mu$); ils peuvent être attribués respectivement à la vibration de valence de $\text{C}=\text{O}$ ester et aux vibrations de déformation de $-\text{CO}-\text{NH}-$ et $\text{N}-\text{H}$. Il existe, d'autre part, un pic non identifié à 1165 cm^{-1} ($8,58\text{ }\mu$) qui semble caractéristique du lipide A.

Structure moléculaire du lipide A. Ayant isolé le lipide A de diverses Salmonelles, NOWOTNY (232, 234, 235) a étudié particulièrement la structure d'une fraction " A_{II} " purifiée sur colonne d'acide silicique et paraissant homogène en chromatographie sur papier silicé. Il s'agit d'un phosphomucolipide contenant 1,9-2,2 p.100 de phosphore, 18,1-20,5 p.100 de glucosamine et 50-55 p.100 d'acides gras. Après hydrolyse acide, les acides gras solubles dans l'éther sont ceux que l'on rencontre dans les lipopolysaccharides correspondants; tandis que la phase aqueuse contient des petites quantités d'acide aspartique, d'acide glutamique, d'alanine, de sérine, de valine, d'arginine et de lysine à côté de quantités importantes d'acide phosphorique et d'esters phosphoriques de la glucosamine. Il s'agit du 1-peptido, 4-phospho D-glucosaminide, de la 4-phospho D-glucosamine, et de la 6-phospho D-Glucosamine. L'auteur a montré que celle-ci se formait à partir de la précédente, par transphosphorylation, au cours de l'hydrolyse acide. La libération d'acide phosphorique par la diesterase de venin, alors que les phosphatases acide et alcaline n'exercent aucune action, tend à prouver que les molécules de la glucosamine sont liées entre elles par des liaisons phospho-diesters. L'hydrazinolyse montre, d'autre part, que les fonctions amines de la glucosamine sont acylées. Environ 30 p.100 des acides gras seraient liés aux groupements aminés, 35-40 p.100 seraient liés au carbone 3 et le reste au carbone 6, par des liaisons esters.

Partant de ces données analytiques, NOWOTNY (232, 235) a proposé, pour la fraction "A_{II}" la structure suivante :

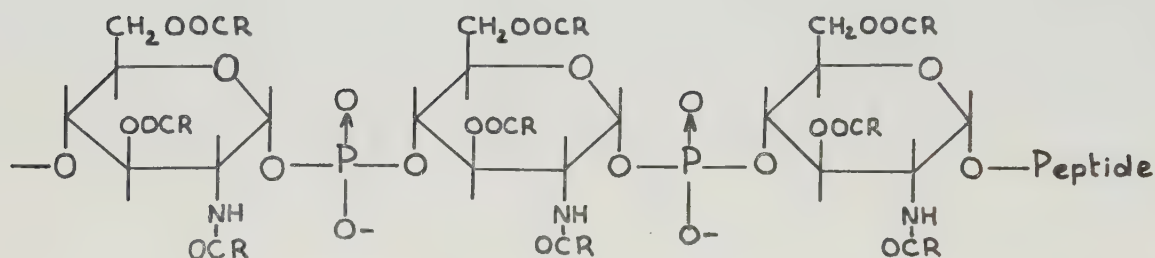


Figure 4. Structure de la fraction lipidique A_{II} d'après NOWOTNY (232, 235).

Il s'agirait là d'un phosphomucolipide d'un type nouveau formé d'une chaîne poly-D-glucosamine-phosphate dont les fonctions alcools seraient estérifiées et les fonctions amines amidifiées par des acides gras.

Plus récemment, BURTON et CARTER (67) ont isolé également un lipide A à partir d'un lipopolysaccharide purifié extrait d'Escherichia coli OIII-B₁₄. Par fractionnement à l'aide de l'acétone, suivi de chromatographie sur colonne d'acide silicique, ils en ont séparé le constituant principal "A_{III}" qui représente 70-80 p.100 du lipide brut, et se comporte comme une substance homogène lorsqu'il est rechromatographié. Il s'agit d'un phospholipide ayant un poids moléculaire de 1700 ± 40 et contenant 20 p.100 de glucosamine, 1,83 p.100 de phosphore, 60-70 p.100 d'acides gras; des groupements O-acétyl, du calcium et du magnésium. Les principaux acides gras sont les acides laurique, myristique, β hydroxymyristique et un acide se

comportant en chromatographie en phase gazeuse comme l'acide β -hydroxy décanoïque. D'après ces auteurs, le poids moléculaire et les données analytiques correspondraient à un motif structural constitué de deux molécules de glucosamine, un groupement phosphate, trois ou quatre groupements acétyl et cinq acides gras à longue chaîne. La moitié de ceux-ci sont hydroxylés, ce qui permettrait la fixation des groupements O-acétyl. Il restait à déterminer si les deux molécules de glucosamine se trouvent liées par une liaison osidique ou par un pont phosphodiester. Etant donné que la réduction complète du lipide A_{III} par le borohydrure de sodium s'accompagne d'une transformation de la moitié de la glucosamine en glucosaminol, BURTON et CARTER (67) pensent qu'on se trouverait en présence d'une liaison osidique. Deux molécules de glucosamine liées par une liaison phosphodiester seraient, en effet, complètement réduites en glucosaminol. La structure du lipide A_{III} serait donc la suivante :

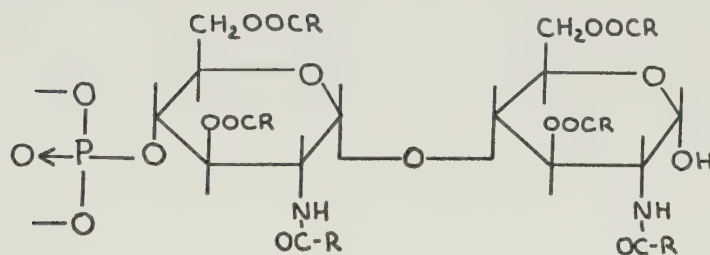


Figure 5. Structure de la fraction A_{III} , d'après BURTON et CARTER (67).

Nous verrons, dans la discussion qui suivra la partie expérimentale, ce qu'on peut penser de ces études structurales concernant le lipide A.

Il nous paraît intéressant de noter qu'on n'a jamais isolé, jusqu'à présent, de mutant de bactérie à Gram négatif ne possédant pas de lipide A. D'autre part, il n'a pas été démontré que les lipides des endotoxines étaient différents pour les variantes S et R d'une même espèce.

Lipide A et complexes artificiels. MORGAN et coll. (34, 35, 236, 237) ont découvert que les lipopolysaccharides ou "polysaccharides non dégradés" de même que les lipoprotéines ou "protéines conjuguées", provenant des endotoxines des bactéries à Gram négatif, peuvent s'unir à divers constituants pour donner des complexes artificiels. Les lipopolysaccharides, en particulier, peuvent se fixer sur la protéine isolée à partir de l'antigène somatique, mais aussi sur d'autres protéines banales telles que la vitelline, la stromatine ou les globulines du sérum. Le couplage s'effectue en mélangeant les fractions en milieu alcalin, puis en acidifiant progressivement.

Ces observations ont été confirmées par WESTPHAL et coll. (52, 229, 238, 228) dans le cas des lipopolysaccharides préparés par le procédé phénol-eau. Après un traitement bref par un alcali dilué à 37°C, ou par un tampon phosphate de pH 7,8 à + 100°C, ces substances acquièrent, en effet, une grande affinité pour les protéines et les lipides et, tout particulièrement, pour le cholestérol. Les lipopolysaccharides ainsi "activés", peuvent également se fixer sur la surface des érythrocytes, lesquels deviennent alors agglutinables par des antisérums spécifiques (cf.239).

Cette propriété remarquable des lipopolysaccharides et des lipoprotéines est liée à la présence du lipide A. LANDY et coll. (240) ont étudié les modifications survenues après l'activation. Ils ont observé une diminution du taux de lipides liés, quel que soit le procédé utilisé. Ceci traduit probablement une disparition de certaines fonctions esters, mais jusqu'à présent, on n'a pas cherché à identifier les acides libérés.

C H A P I T R E III

PROPRIETES BIOLOGIQUES DU LIPIDE A

Bien que les endotoxines aient été l'objet de travaux considérables au cours de ces dernières décades, on sait finalement très peu de choses des relations existant entre leur structure chimique et la possibilité d'induire certaines réactions caractéristiques chez l'animal ou l'homme. Ceci tient en grande partie au fait qu'on n'a disposé jusqu'à présent que de procédés chimiques pour scinder ces macromolécules. Or, de tels artifices provoquent fatalement des coupures incontrôlables susceptibles d'atténuer ou de faire disparaître complètement les propriétés biologiques des fragments libérés; ils entraînent également une dépolymérisation des endotoxines, ce phénomène pouvant à lui seul modifier d'une façon importante l'activité biologique (241, 242, 243, 85).

Une autre particularité augmente encore la difficulté de cette étude. Certaines propriétés biologiques des endotoxines se manifestent en effet à des doses inférieures au microgramme (244), c'est à dire des quantités que les méthodes chimiques d'analyse et de dosage ne peuvent pas déceler. Il y aura donc toujours lieu de craindre une contamination des préparations par des traces d'endotoxines. Cette crainte est d'autant plus justifiée que l'activité biologique de ces substances n'est pas nécessairement proportionnelle à la quantité de groupements actifs liés au support inerte (143).

C'est en tenant compte de ces restrictions que nous aborderons l'analyse des travaux déjà consacrés à l'étude des propriétés biologiques du lipide A. Toutefois, nous pensons qu'il est nécessaire de rappeler d'abord en quelques mots ce que l'on sait de l'activité des autres fractions.

PROPRIETES BIOLOGIQUES DES POLYSACCHARIDES

Les polysaccharides purifiés extraits des endotoxines possèdent la spécificité de l'antigène O. Ils précipitent lorsqu'on les met en présence de l'immunsérum qui agglutine les bactéries dont ils dérivent (245, 246, 33, 34). En revanche, ils sont incapables d'induire la formation d'anticorps lorsqu'on les injecte à des lapins par voie sous cutanée ou intraveineuse. Il apparaît, en effet, aujourd'hui que l'état d'immunité observé chez l'animal après injection de certaines préparations de polysaccharides extraits de Salmonella doit être attribué à une contamination de ces derniers par des petites quantités d'endotoxine (I30). D'autres observations confirment la fonction haptène de ces polysides. On peut les coupler par diazotation avec certaines protéines inertes comme l'édestine et la stromatine et obtenir ainsi des antigènes qui provoquent la formation d'agglutinines spécifiques des polysaccharides, lorsqu'ils sont injectés à un animal (247, I43, I30).

Il convient, cependant, de noter que les polysaccharides purifiés obtenus par hydrolyse acide ou alcaline ménagée des endotoxines ne peuvent pas saturer toutes les agglutinines apparues dans le sérum après injection d'antigène O complet (248). Ceci est dû probablement à la destruction de certains sites antigéniques, particulièrement des groupements O-acétyles, au cours de l'hydrolyse. L'étude des polysaccharides des Enterobacteriaceae a montré en effet, qu'à chaque facteur antigénique O correspond une structure particulière des différentes chaînes oligosidiques. Ceci a permis de distinguer des chimiotypes dans chacun des sérotypes de Salmonella. (94). Certaines mutations spontanées ou provoquées des bactéries, soit au cours de la transformation par l'ADN d'autres espèces, soit au cours de la transduction ou de la conversion par des phages, peuvent modifier la structure des polysaccharides et changer du même coup la spécificité sérologique de ces derniers. Parallèlement la lysotypie du germe peut se modifier, car les polysaccharides contiennent les sites récepteurs spécifiques qui permettent à certains phages de se fixer à la surface des bactéries (249, 250, 94, I30).

Notons enfin que les polyosides spécifiques des bactéries sont dépourvus de toxicité lorsqu'ils sont à l'état pur. Ils possèdent, d'autre part, une propriété biologique importante découverte par DELAUNAY; ce sont des agents très actifs pour provoquer l'appel des leucocytes polynucléaires dans les foyers d'infection bactérienne (25I).

PROPRIETES BIOLOGIQUES DE LA FRACTION PROTEINIQUE.

Nous avons vu que le constituant protéinique de l'endotoxine se retrouve dans les neurotoxines et dans les bactériocines de certaines bactéries à Gram négatif et qu'il semble porter certains sites antigéniques de l'antigène O complet (cf. p.23). Mais il est également important de savoir dans quelle mesure ce constituant intervient dans les propriétés biologiques de l'endotoxine.

D'après LANDY et coll. (I62, I63), il est possible d'éliminer presque toute la protéine de cette dernière sans qu'on puisse observer pour autant une diminution de l'activité biologique. Ce point devait être confirmé par RIBI et coll. (I64); et l'on admet aujourd'hui d'une manière générale que la fraction protéinique ne joue pas un rôle essentiel. Toutefois, divers travaux conduisent à penser que la protéine peut intervenir dans le pouvoir immunogène de l'endotoxine. En effet, d'après MORGAN et PARTRIDGE (34), l'antigène somatique de Shigella dysenteriae perd ses propriétés antigéniques chez le lapin, lorsqu'on élimine complètement la fraction protéinique. Plus récemment, TAKEDA et coll. (2I7) ont constaté que le lipopolysaccharide de Salmonella paratyphi B est moins antigénique pour ce même animal que le complexe glucido - lipido - protéique correspondant. Enfin, d'après WESTPHAL (53), le pouvoir immunogène du lipopolysaccharide d'Eberthella typhi est plus élevé pour une préparation contenant 3,5 p.100 d'azote que pour une autre qui n'en contient que 0,7 p.100.

PROPRIETES PYROGENES DU LIPIDE A.

Rôle du Lipide

Les lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif se montrent fortement pyrogènes lorsqu'on les injecte aux animaux ou à l'homme (9I, 228, I34), cette propriété étant déjà utilisée depuis longtemps à des fins thérapeutiques. Chez le lapin, une dose aussi faible que $1 \cdot 10^{-9}$ g/Kg par voie intraveineuse suffit pour provoquer une réaction fébrile significative (55, 252). L'augmentation de la température se fait suivant une courbe biphasique qui présente un premier clocher vers 1 heure et un second, généralement plus important, vers 3 heures (252). Diverses unités ont été proposées pour exprimer la réponse en fonction de la dose : dose minima pyrogène ou D M P (253), indice de fièvre, qu'il s'agisse de I F (254) ou I F₄₀ (255, 24I), réponse fébrile à 3 heures ou D M P₃ (256, 252)). Chez le lapin, la D M P₃ est proportionnelle à la dose d'endotoxine injectée, pour des doses comprises entre $1 \cdot 10^{-9}$ et $1 \cdot 10^{-6}$ g/Kg (252). La réponse fébrile diffère cependant suivant l'espèce animale utilisée (255). Notons enfin que l'hyperthermie observée s'accompagne de modifications sanguines : leucopénie suivie de leucocytose, lymphopénie et éosinopénie caractéristique qui traduirait, selon certains auteurs, une activation du système hypophyse-surrénales (55, I34).

Le lipide A isolé et purifié possède également une activité pyrogène; mais celle-ci s'est révélée beaucoup plus faible (au moins dix fois) que celle du lipopolysaccharide correspondant (55). Des expériences effectuées par WESTPHAL et coll. (9I, 228) montrent que cette différence d'activité peut être attribuée à l'insolubilité du lipide A dans l'eau. En effet, lorsque ce lipide est en suspension aqueuse, il est nécessaire d'en injecter au lapin $1 \cdot 10^{-4}$ g/Kg, par voie intraveineuse, pour obtenir un effet pyrogène. La dose minimale active tombe entre $1 \cdot 10^{-6}$ et $1 \cdot 10^{-5}$ g/Kg lorsqu'on disperse le lipide A au moyen d'une solution de Tween; elle descend à $1 \cdot 10^{-8}$ g/Kg lorsqu'on le couple avec une protéine inerte ou avec du Dextran (I34). On n'obtient cependant jamais de préparations aussi actives que les endotoxines (242, 42), ce qui pourrait s'expliquer par une dégradation partielle survenue au cours de la libération du lipide par l'hydrolyse acide.

Si l'on injecte quotidiennement des doses subléthales d'endotoxine on obtient une diminution progressive de la réponse fébrile pouvant aller jusqu'à la disparition complète de second clocher de la courbe de température (252). Ce phénomène de "tolérance" a pu être observé aussi bien chez l'homme que chez le lapin et chez le chien (257). D'autre part, il ne s'applique pas seulement à la pyrogénicité, mais également aux autres effets de l'endotoxine (257). On sait qu'il est indépendant de la spécificité antigénique de cette dernière et on admettait jusqu'à présent qu'il n'était pas lié à l'apparition de l'immunité (257). Toutefois, divers groupes de chercheurs ont montré récemment qu'on pouvait transférer la tolérance d'un animal à un autre par injection de sérum (252, 258, 259, 260). Les interprétations proposées sont loin d'être concordantes (261, 262, 263, 252, 257). Il semble que l'endotoxine possède, tout au moins chez l'homme, deux fonctions antigéniques bien distinctes et qu'à côté de l'anticorps agglutinant, spécifique mais non protecteur, elle fait apparaître dans le sérum un anticorps protecteur. Il s'agirait de la macroglobuline I9 S naissant et disparaissant plus rapidement que les autres anticorps (7 S) (252). La tolérance pourrait être aussi liée à l'apparition ou à l'activation d'un facteur détoxifiant dans le système réticulo-endothélial (263). Seule l'identification chimique de ces constituants pourra résoudre le problème.

On a pensé que l'apparition des facteurs responsables de la tolérance devait être induite par le lipide A. En fait, WATSON et KIM (252) n'ont pas pu produire chez l'animal une tolérance croisée vis à vis de l'endotoxine d'Escherichia coli et du lipide A purifié correspondant.* Cependant, étant donné que l'endotoxine devient elle-même inactive si l'on fait disparaître complètement les fonctions esters qui s'y trouvent, il est probable que l'absence d'activité du lipide A purifié est due à la disparition d'un groupement actif acido-labile au cours de l'hydrolyse (252).

* MERGENHAGEN et coll. (211) n'ont pas obtenu de meilleurs résultats avec des fractions extraites de Neisseria méningitidis.

Mécanisme de l'action pyrogène

On admet actuellement que l'action pyrogène des endotoxines s'explique par la libération dans le sérum d'un médiateur endogène d'origine leucocytaire ou tissulaire (264). L'existence d'un mécanisme indirect semble en effet démontré par le temps de latence qui s'écoule entre l'injection de l'endotoxine et l'élévation de la température (265, 134); il est de 40 à 60 minutes chez l'homme (266), de 60 à 90 minutes chez le cheval (265). Les effets du pyrogène endogène se manifestent après un temps de latence beaucoup plus court (266, 267). D'autre part, contrairement à l'endotoxine, ce pyrogène est thermolabile et n'induit pas de phénomène de tolérance par des injections répétées (268, 269, 270, 264). Il disparaît du sérum des animaux rendus tolérants vis à vis de l'endotoxine; mais il reparait si on supprime la tolérance, soit en augmentant la dose d'endotoxine, soit en bloquant le S R E par une injection d'oxyde de thorium (264),

POUVOIR LÉTAL DU LIPIDE A

Rôle du lipide

La pyrogénicité des endotoxines n'est qu'un aspect de leur toxicité. Ces substances peuvent en effet tuer les animaux de laboratoire à des doses qui varient très largement suivant la voie d'introduction, suivant l'espèce animale utilisée et même suivant l'individu. On sait, d'autre part, qu'une légère élévation de la température corporelle augmente considérablement cette toxicité (271, 272).

Dès 1945 GOEBEL et coll. (90, 219) avaient constaté que le pouvoir létal de l'endotoxine était lié à la présence d'un constituant toxique qu'ils appelèrent composant " T ", sans donner d'indication sur la nature chimique de ce dernier. Une dizaine d'années plus tard, WESTPHAL, LUDERITZ et coll. (91, 229, 134) ont montré qu'il s'agissait manifestement du lipide A. En fixant ce dernier sur une protéine inerte comme la caséine ou la sérumalbumine, ils ont pu en effet obtenir une lipoprotéine artificielle dont le pouvoir pyrogène et toxique peut atteindre le dixième et parfois le cinquième

de celui de l'endotoxine. D'après ces auteurs, le lipide A d'Escherichia coli dispersé à l'aide de Dextran, tue 50 p.100 des souris lorsqu'il est injecté par voie intraveineuse à la dose de 5.10^{-5} g/Kg (229). KASAI et coll. (209) ont pu administrer à des souris 4 mg de lipide A, par voie intrapéritonéale, sans observer d'autres troubles qu'une perte de poids passagère. En fait, selon RIBI et coll. (242), il est difficile de comparer le pouvoir létal du lipide A à celui des endotoxines correspondantes, car la lipide tue très peu de souris même à des doses relativement fortes. D'autre part, des quantités de lipide A allant jusqu'à 10 mg ont été injectées par voie intraveineuse à des lapins sans causer de shock ou de mort, bien que des quantités beaucoup plus faibles suffisent pour provoquer une hyperthermie.

Comme dans le cas de la pyrogénicité, la faible toxicité du lipide A par rapport à l'endotoxine s'expliquerait, selon WESTPHAL et coll., par son insolubilité dans l'eau ou par une inactivation partielle consécutive à l'hydrolyse acide. En revanche, RIBI et coll. (242, 63, 42) affirment que cette différence doit être attribuée au fait que le lipide A n'est pas le toxophore de l'endotoxine. Il n'existe pas en effet de relation entre la toxicité des endotoxines et leur teneur en lipides liés (41). Bien plus, l'hydrolyse acide ménagée détruit le pouvoir létal de ces substances avant qu'on puisse mettre en évidence une libération des lipides (241). Il faudrait donc admettre avec ces auteurs que l'activité de l'endotoxine serait liée exclusivement à la fraction polysaccharidique. Beaucoup d'arguments vont à l'encontre de cette hypothèse. La toxicité est en effet indépendante de la nature chimique du polysaccharide, puisque des endotoxines provenant de différents mutants d'une même espèce bactérienne ont la même activité que l'endotoxine extraite de la souche originale (273). D'autre part, divers traitements chimiques permettent de diminuer considérablement la toxicité des endotoxines sans affecter leur pouvoir immunogène ni leur spécificité sérologique (274, 280). Or, on sait actuellement que le résultat de ces traitements est d'éliminer une partie des acides gras liés par des fonctions esters (274, 278). Notons enfin que les systèmes enzymatiques d'origine humorale ou cellulaire, qui sont capables de détoxifier l'endotoxine in vitro, agissent au niveau de la fraction lipidique (229, 281, 223). Toutefois, il n'est pas

certain que cette activité soit liée à la totalité de la fraction lipidique. FREEDMAN et coll. (282, 283) ont en effet montré qu'on pouvait, en acétylant l'endotoxine, augmenter la toxicité de cette dernière tout en réduisant sa pyrogénicité.

Mécanisme de l'action létale

D'après FINE (284), le pouvoir létal de l'endotoxine s'expliquerait avant tout par une excitation du système nerveux orthosympathique se manifestant au niveau des viscères du territoire splanchnique, plus particulièrement au niveau du foie et de l'intestin. Les nécroses tissulaires observées dans ces derniers seraient consécutives à une libération locale de noradrénaline. Les travaux de WEISMAN et THOMAS (285) et ceux de JANOFF et KALEY (286) font apparaître l'importance du rôle des lysosomes dans ces phénomènes de nécrose. A forte dose, l'endotoxine altère en effet la membrane de ces organites cellulaires, ce qui a pour effet de libérer la β glycuronidase et les cathepsines. Du même coup, l'action protectrice de la cortisone vis à vis de l'endotoxine s'explique clairement puisque cette substance stabilise les lysosomes in vivo (286). D'autre part, le phénomène de "tolérance", provoqué par des injections répétées de doses sublétales d'endotoxines, serait dû à une sélection progressive de lysosomes plus résistants et plus jeunes (285). Il est d'ailleurs probable que l'effet de l'endotoxine sur les lysosomes est indirect. Celui-ci résulterait d'une augmentation de la glycolyse qui, en abaissant le pH intracellulaire, rendrait ces particules plus fragiles (285). Notons enfin que l'endotoxine est 20 fois plus active si on utilise pour l'introduire la voie intracérébrale au lieu de la voie intraveineuse (284) et qu'il existe un centre particulièrement sensible à son action au niveau de l'hypothalamus postérieur (272). Celui-ci serait constitué de cellules tolérant mal l'augmentation de la glycolyse qui, selon WOODS et coll. (287, 288) est un des effets fondamentaux de l'endotoxine sur le métabolisme cellulaire.

D'une façon générale, les animaux nouveaux-nés sont nettement moins sensibles que les adultes à l'action létale de l'endotoxine (289). On peut augmenter considérablement cette sensibilité (100 à 1000 fois) par une

injection préalable de bactéries à Gram négatif vivantes ou tuées ou, de B C G (290, 291, 289, 292). Il s'agit là d'un phénomène d'hyperréactivité vis à vis de l'endotoxine, bien différent de l'hypersensibilité retardée dont le mécanisme est de nature immunologique (293). Dans le cas des mycobactéries, on a pu identifier le facteur responsable de cette sensibilisation; il s'agit du "cord factor" ou 6-6'dimycolate de tréhalose, qui est un glycolipide de la paroi ectoplasmique (294, 295). Une augmentation de la sensibilité vis à vis des endotoxines peut également survenir au cours d'infections dues à des bactéries à Gram négatif ou à la suite d'une libération d'endotoxines à partir de l'intestin (289). Inversement, il est possible de réduire cette sensibilité en injectant de la cortisone à forte dose ou en administrant d'une façon répétée des quantités croissantes de lipopolysaccharide. Dans ce dernier cas, la désensibilisation est indépendante de la spécificité antigénique de l'endotoxine utilisée et il n'est pas possible de l'obtenir en injectant la fraction polysaccharidique purifiée (290). On pouvait donc penser raisonnablement que le phénomène de sensibilisation était dû au lipide A. MERGENHAGEN et coll. (223) ont prouvé récemment le bien fondé de cette hypothèse, en montrant que le lipide A de Neisseria meningitidis est plus efficace que le lipopolysaccharide pour augmenter la sensibilité de la souris vis à vis de l'endotoxine d'Escherichia coli.

Notons, pour terminer, qu'il existe dans le sérum normal, le foie et la rate des animaux et de l'homme des facteurs capables de détoxifier l'endotoxine in vitro (cf. 263, 296). Certains d'entre eux se sont même révélés actifs in vivo (263). Toutefois, l'élimination de l'endotoxine se fait très lentement, puisque cette dernière demeure dans le plasma pendant plusieurs heures (296), et peut encore être mise en évidence dans les tissus plusieurs semaines après son introduction (297).

ACTION DU LIPIDE A SUR L'IMMUNITE NON SPECIFIQUE

Rôle du lipide

On sait, depuis plusieurs décades, que l'injection intrapéritonéale de substances irritantes augmente considérablement la résistance de l'hôte vis à vis d'un certain nombre d'agents pathogènes (cf. 298). Cependant, l'étude de cette immunité non spécifique ou "proimmunité" a été longtemps négligée au profit de celle de l'immunité spécifique et il a fallu attendre ces dix dernières années pour qu'une série de découvertes attirent l'attention sur ce problème important (cf. 299, 303).

Il est apparu en effet, que l'injection de bactéries à Gram négatif vivantes (298) ou tuées (304) est un des moyens les plus efficaces pour induire la proimmunité chez l'animal. Une constatation particulièrement intéressante fut faite par ROWLEY en 1955 (305). Celui-ci a pu observer que l'injection intrapéritonéale ou intraveineuse de parois ectoplasmiques d'entérobactéries modifie la sensibilité de la souris vis à vis de l'infection par Escherichia coli. Après une diminution passagère qui dure 24 heures (phase négative), l'immunité non spécifique se trouve nettement augmentée pendant une période de cinq jours environ. Des essais ultérieurs effectués avec des fractions purifiées devaient démontrer que le principe actif n'était pas autre chose que le lipopolysaccharide de l'endotoxine (304, 306, 313). A des doses aussi faibles que 1.10^{-6} à 5.10^{-5} g, celui-ci peut en effet protéger la souris contre un large éventail d'agents pathogènes comprenant aussi bien des bactéries à Gram positif et à Gram négatif que des virus et des protozoaires (cf. 300, 314). L'augmentation de l'immunité non spécifique ne dure généralement pas plus de deux semaines chez l'animal; d'autre part, elle n'est pas modifiée par des injections répétées de lipopolysaccharide (303).

HOWARD, ROWLEY et WARDLAW (315) constatèrent rapidement que les lipopolysaccharides doivent eux mêmes cette propriété remarquable à la présence du lipide A. En effet, tandis que la fraction polysaccharidique est inactive, le lipide A purifié et dispersé à l'aide d'"Aérosol OT" provoque

une augmentation significative de l'immunité non spécifique chez la souris, lorsqu'il est injecté par voie intraveineuse à la dose de 8.10^{-6} g. Ces résultats devaient être confirmés par HURNI, WESTPHAL et coll. (310, 229, 134, 316). Ceux-ci ont montré qu'une injection intrapéritonéale de 1.10^{-4} g de lipide A dispersé dans une solution à 0,5 p.100 de dextran provoque, chez la souris, une augmentation considérable de la résistance aux infections, puisque la dose mortelle d'Escherichia coli est multipliée par plus de 100.000. Ils ont noté par ailleurs un fait particulièrement important : on n'observe pas de phase négative, même avec des doses aussi fortes que 1 mg de lipide A. D'une façon générale, le pouvoir de protection non spécifique de ce constituant est cependant bien plus faible que celui de l'endotoxine, même si on le calcule sur la base de la teneur en lipide A de cette dernière (315, 242, 300). Il existe toutefois des exceptions, puisque MERGENHAGEN et coll. (223, 211) ont trouvé une activité égale pour l'endotoxine et le lipide A de Neisseria méningitidis, à la fois chez la souris et le lapin. En réalité, il n'existe pas de relation étroite entre eux puisqu'on peut obtenir des lipides très actifs à partir d'endotoxines qui le sont relativement peu et vice versa (242).

Mécanisme de l'activation de l'immunité non spécifique

Si le rôle du lipide A dans l'activation de l'immunité non spécifique peut-être facilement mis en évidence, il est en revanche difficile d'expliquer ce phénomène, étant donné la multiplicité des facteurs susceptibles d'y intervenir. Quelques auteurs ont vu une corrélation entre l'augmentation de la résistance naturelle aux infections et l'élévation du taux de certains facteurs humoraux comme le lysozyme (317, 318), la phosphatase alcaline (319), la phosphatase acide (320), la β succinoxydase (321) et les cathepsines, que l'on trouve dans le sérum à côté de divers anticorps (301) et opsonines (322). D'autres ont attribué un rôle prépondérant à certains facteurs antimicrobiens actifs in vitro, tels que le principe détoxifiant de HEGEMAN (323), la properdine de PILLEMER (324, 306), le facteur bactéricide de WEDGWOOD (325) ou l'obsistine de COLOBERT et KIRN (326, 327). Il n'est d'ailleurs pas exclu que ces facteurs contiennent des fractions protéiques communes. Or, à la dose nécessaire pour stimuler l'immunité non spé-

cifique, l'endotoxine augmente le taux de protéines du sérum, cette augmentation étant limitée aux α et β globulines (303).

Cependant, d'après HALPERN et coll. (328) l'augmentation de l'immunité non spécifique doit être attribuée avant tout à une activation du SRE. Effectivement, l'endotoxine augmente le pouvoir colloïdo-pexique de ce dernier, suivant un processus biphasique dont l'évolution dans le temps est comparable à celle de l'immunité non spécifique (329). Cette stimulation comporterait différentes étapes : absorption de l'endotoxine par le SRE (281), augmentation du nombre de cellules de Kupffer dans le foie et de macrophages dans la rate (281), cette augmentation étant due à la division rapide des cellules qui ont phagocyté l'endotoxine (330), stimulation de la glycolyse dans les cellules compétentes entraînant la destruction des lysosomes et la libération des enzymes intervenant dans la digestion des bactéries (303). Parallèlement, le pouvoir opsonisant du sérum vis à vis des bactéries (322) et des particules de carbone (331) est considérablement augmenté. On observe en particulier une nette élévation du taux des anticorps spécifiques des bactéries à Gram négatif et ceci quelle que soit la spécificité antigénique des lipopolysaccharides injectés (332).

La "phase négative" qui précède l'activation de l'immunité non spécifique s'expliquerait par l'insuffisance du taux d'opsonines au départ (331). Divers auteurs ont en effet montré que ces substances sont indispensables pour la phagocytose des bactéries par le SRE (333, 334, 335). Parmi eux FUKUI (335) a insisté particulièrement sur la nécessité de la présence d'anticorps spécifiques. Toutefois, il est possible également que la phase négative soit due à la leucopénie qui suit immédiatement l'injection d'endotoxine, ou encore à une altération des cellules intervenant dans la phagocytose (336). En effet, la chute passagère de l'immunité non spécifique ne s'observe qu'avec des doses relativement importantes d'endotoxines.

L'hypothèse d'une activation du SRE par le lipide A paraît très séduisante. Il est en effet démontré à l'heure actuelle que divers lipides, et, parmi eux, des constituants aussi simple que la trioléine, peuvent conduire à ce résultat (338, 339, 337). Toutefois on ne sait pas encore à

quelle structure chimique il faut attribuer cette activité. Notons enfin que les lipopolysaccharides conservent leur pouvoir de stimulation de l'immunité non spécifique après détoxification par certains procédés chimiques (340,278).

PROPRIETES ADJUVANTES DU LIPIDE A

Rôle du lipide A.

Dès 1926, RAMON et ZOELLER (341) avaient constaté que l'addition du vaccin antityphique à l'anatoxine tétanique augmente le taux d'antitoxine dans le sérum, lorsque ces deux substances sont injectées ensemble. Dix ans plus tard, BORDET (342) a pu obtenir le même effet en associant Bordetella pertussis à l'anatoxine diphtérique. A partir de 1940, de nombreux travaux ont permis de confirmer ces observations, particulièrement ceux de Mac LEAN et HOLT (343), ceux de GREENBERG et FLEMING (344) et ceux de BARNES et HOLT (345).

On devait découvrir par la suite (343, 344, 346, 347) que ce pouvoir adjuvant des bacilles typhiques était lié à un lipopolysaccharide possédant à la fois les propriétés antigéniques (163) et toxiques (348) caractéristiques de l'antigène somatique.

C'est également à l'endotoxine qu'on a pu rapporter l'activité adjuvante de Bordetella pertussis (345, 349, 350, 346, 347). Du moment que des lipopolysaccharides provenant d'espèces différentes manifestent cette propriété en présence de protéines très diverses, on pouvait penser que la fraction active est la même pour toutes les endotoxines. Effectivement, ROWLEY (351), puis WESTPHAL et coll. (134, 352) ont montré que c'est le lipide A de l'endotoxine qui est responsable de l'activité adjuvante. Si l'on injecte celui-ci en même temps que des polysides pneumococciques à des vaches gravides, la concentration des anticorps est augmentée dans le colostrum (134). FARTHING et coll. (353, 354) ont confirmé depuis cette propriété du lipide A. Cependant, le pouvoir adjuvant de ce dernier étant inférieur à celui de l'endotoxine, ces auteurs pensent que la dimension de la molécule,

de même que le degré de dispersion interviendraient dans le phénomène.

Mécanisme de l'activité adjuvante

On a cru tout d'abord que l'effet adjuvant allait de pair avec la toxicité; l'endotoxine perd en effet ses propriétés adjuvantes chez les animaux rendus tolérants vis à vis des troubles profonds qui caractérisent son injection in vivo (346, 355). Cette hypothèse ne peut être retenue, puisque diverses préparations d'endotoxines détoxifiées se sont montrées capables de stimuler la production d'anticorps (279, 280).

S'il est admis, actuellement, que l'effet adjuvant peut être attribué à une stimulation des cellules compétentes, se traduisant à la fois par une activation des processus de division cellulaire et de biosynthèse des anticorps, on ignore, en revanche, pratiquement tout des mécanismes mis en jeu (356).

D'après JOHNSON (357), on peut cependant retenir que l'activité adjuvante de l'endotoxine est limitée, chez le lapin, aux premières étapes de la réponse immunitaire aux antigènes protéiques. On peut, toutefois, observer des réponses différentes, suivant les espèces animales utilisées. D'autre part, les modifications humorales apparentes correspondent à une augmentation des constituants I9 S et 7 S des anticorps.

Structures chimiques responsables des propriétés adjuvantes

L'adjuvant le plus couramment utilisé est "l'adjuvant de FREUND", constitué d'une émulsion de bacilles tuberculeux morts dans de l'huile de paraffine (358, 359). Or les travaux de RAFFEL et coll. (360), ainsi que ceux de WHITE et coll. (361) ont montré que les "cires purifiées" des mycobactéries possèdent des propriétés adjuvantes au même titre que les bacilles entiers. En fait, dans les souches humaines, ce sont les cires D qui sont actives (362), et ce point est intéressant à noter, car ces dernières sont des peptidoglycolipides, dont la structure est très voisine de celle des

lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif (cf. 205). En revanche, les cires D des souches bovines sont inactives. Comme celles-ci ne se différencient des cires D des souches humaines que par l'absence de la fraction peptidique, il semble que cette fraction joue un rôle fondamental dans l'activité adjuvante (363), d'autant plus que - nous l'avons vu - le lipide A purifié possède encore un résidu peptidique. D'après WHITE et coll. (363), il est cependant nécessaire que le polypeptide soit couplé avec un glycolipide.

Autre constatation importante, les résidus bacillaires des mycobactéries conservent une activité adjuvante après enlèvement des lipides libres, mais ils perdent cette propriété après élimination des lipides liés (360).

PROPRIETES ANTITUMORALES DU LIPIDE A

Rôle du lipide A

En se basant sur le fait que des malades porteurs de tumeurs malignes présentaient souvent une rémission durant une infection bactérienne aiguë telle que l'érysipèle *, COLEY, en 1894 (364), fut le premier à tenter de guérir ces tumeurs à l'aide de toxines provenant de cultures de streptocoques hémolytiques et de Serratia marcescens. En 1931, GRATIA et LINZ (365), étudiant la réaction de Shwartzman, constatèrent qu'en injectant des filtrats de culture d'Escherichia coli à des cobayes porteurs de liposarcomes transplantés on obtenait une lésion hémorragique intense au niveau des tumeurs. L'année suivante, SHWARTZMAN et MICHAILOWSKI (366) provoquèrent une nécrose hémorragique du sarcome 180 de la souris par administration de filtrats de cultures de méningocoques, aucune lésion n'apparaissant dans les tissus normaux.

* On trouvera l'historique de la question dans un article récent de MOSE (378)

Par la suite SHEAR et coll. (367, 369, 80), IKAWA et coll. (225), puis RATHGEB et SYLVEN (370, 371) ont purifié les facteurs responsables de la nécrose des tumeurs contenus dans les milieux de culture et montré qu'il s'agissait de complexes glucido-lipido-protéiques analogues aux endotoxines des bactéries. Parallèlement, en recherchant les fractions actives dans les bactéries elles-mêmes, FOGG (372), GARDNER et coll. (373) puis SHAPIRO (374) ont constaté que les constituants les plus efficaces étaient riches en glucides. Cependant, on devait découvrir rapidement que leur activité antitumorale était indépendante de leur teneur en acides aminés (225, 373, 374, 369) ou en glucides (371, 373, 369) ainsi que de leur poids moléculaire (225, 375).

En 1939, WALKER et HANDMAN (376) attribuaient déjà l'activité antitumorale des endotoxines à quelque substance spéciale présente en petite quantité et difficile à séparer des autres constituants par les méthodes physicochimiques ordinaires. Plus récemment, ZAHL (377) a constaté que les complexes glucido-lipido-protéiques perdaient leur activité après hydrolyse acide ménagée.

Mais c'est seulement vers 1961 que WESTPHAL, NETER et coll. (379, 380), ont pu démontrer que cette propriété remarquable était liée à la présence du lipide A. Ce dernier, après avoir été séparé et purifié, provoque en effet une nécrose hémorragique des tumeurs, lorsqu'il est injecté à des souris porteuses de sarcome I80 (379, 380). Il faut cependant quatre à cinq fois plus de lipide A que de lipopolyoside pour obtenir le même résultat; mais, tandis que le lipopolyoside est plus actif par voie intraveineuse que par voie intrapéritonéale, le lipide A est aussi actif dans les deux cas, la dose nécessaire étant de 1.10^{-5} g environ pour une souris de 20 g. (380).

Au même moment les travaux de KASAI et coll. (209) sont venus éclairer d'une lumière nouvelle ce problème. Ces auteurs ont montré qu'en injectant une suspension aqueuse ou huileuse de lipide A à des souris préalablement inoculées par voie intrapéritonéale avec des cellules cancéreuses de l'ascite d'Ehrlich, on constate que 40 à 60 p.100 des animaux traités

survivent, alors que tous les animaux témoins qui n'ont pas reçu de lipide meurent avant le 20^{ème} jour. L'autopsie pratiquée sur les survivants, sacrifiés après plusieurs semaines d'observation, n'a permis de déceler ni ascite, ni cellules tumorales dans la cavité abdominale, ni modifications macroscopiques dans les organes internes. Ces résultats ont été obtenus en injectant quotidiennement aux souris 100 µg de lipide A par voie intrapéritonéale, pendant sept jours consécutifs. En revanche, ce lipide est nettement moins actif lorsqu'on pratique une injection unique de 500 µg et il perd totalement son effet inhibiteur si on l'administre par voie sous cutanée. Il s'est révélé, d'autre part, inactif sur la forme tumorale du carcinome d'Ehrlich (209), ce qui confirmerait les observations de SUGIURA (381) selon lesquelles le "polysaccharide de Shear" inhibe le développement de l'ascite d'Ehrlich, mais n'agit pas sur la tumeur solide correspondante. KASAI et coll. (209) ont constaté par ailleurs qu'une seule injection de lipide A ne produit aucun effet inhibiteur ni sur la forme ascitique, ni sur la forme tumorale du sarcome 37, bien qu'une nécrose hémorragique soit apparue. D'après des résultats partiels, il semble que la forme tumorale soit sensible à des injections répétées de lipide A.

On voit immédiatement tout l'intérêt pratique que peut présenter cette propriété remarquable du lipide A. On a vite constaté, en effet, que des faibles doses d'endotoxines ne suffisaient pas pour produire une régression complète des tumeurs expérimentales, mais que la toxicité de ces produits empêchait par ailleurs leur utilisation à forte dose (369). Il est apparu, d'autre part, que l'action inhibitrice des lipopolysaccharides sur les tumeurs solides ne se manifeste qu'au bout de un à trois mois (382, 383, 384). Les essais cliniques effectués avec des produits d'origine microbienne ont nécessité également des injections répétées pendant une longue période (385, 386). Certes PRIGAL (387) a pu montrer qu'en dispersant les lipopolysaccharides dans une émulsion d'eau et d'huile minérale on pouvait injecter aux souris par voie intramusculaire des doses aussi fortes que quatre DL_{50} et obtenir ainsi une résistance prolongée contre le sarcome expérimental. Il n'en demeure pas moins que le lipide A, bien moins toxique et plus efficace (209), constitue un matériel expérimental plus intéressant. Mais, pour qu'à

l'avenir les différents résultats puissent être comparés, il sera nécessaire d'opérer avec des fractions lipidiques bien définies et d'adopter un protocole expérimental parfaitement standardisé.

Structures chimiques responsables de l'activité antitumorale

Il paraît difficile d'attribuer les propriétés antitumorales du lipide A à une contamination de ce produit par du lipopolysaccharide intact. En effet, la plupart des travaux particulièrement ceux de NETER et coll. (216, 379, 380), ont été réalisés avec une fraction lipidique hautement purifiée contenant moins de 0,01 p.100 de polysaccharide. D'autre part, KASAI et coll. (209) ont, au cours d'une expérience, obtenu une régression des tumeurs par injection de lipide A d'Escherichia coli, alors que l'injection de lipopolysaccharide s'est révélée inactive.

Toutefois, il est probable que les propriétés oncolytiques ne sont pas liées à la totalité de la molécule lipidique et que seuls certains sites moléculaires interviennent dans le phénomène. Divers arguments viennent appuyer cette hypothèse. RIBI et coll. (242) ont constaté, par exemple, que des endotoxines extraites par l'éther aqueux conservent leurs propriétés antitumorales bien qu'elles aient été partiellement délipidées par des procédés non hydrolytiques. MORA et YOUNG (86) ont remarqué, d'autre part, qu'après une incubation de deux semaines avec de fortes quantités de lysozyme, la toxicité de l'endotoxine est diminuée de dix fois, alors que son pouvoir oncolytique n'est abaissé que de moitié. Ces deux propriétés étant liées au lipide A, elles doivent donc nécessairement être supportées par deux sites moléculaires différents.

En montrant que la nécrosamine de synthèse lyse les cellules tumorales humaines ou inhibe leur développement in vitro, LEONARDI (388) apportait une explication particulièrement séduisante des propriétés antitumorales du lipide A. Malheureusement, comme nous l'avons déjà vu, la présence de la nécrosamine dans ce dernier paraît peu probable. On en est donc réduit à faire quelques rapprochements. Il est intéressant de noter, par exemple, que des extraits trichloracétiques de certaines bactéries à Gram positif

modifient la sensibilité du derme du lapin vis à vis de l'adrénaline (389) et provoquent également la nécrose hémorragique des sarcomes expérimentaux chez la souris (390, 391, 380, 392). Or ces extraits contiennent des acides teichoïques, c'est à dire des phosphates de polyols dont la structure présente une certaine analogie avec le chaînon fondamental du lipide A. Par ailleurs, WEISS et coll. (393) ont constaté que le B C G vivant ou tué possède aussi des propriétés antitumorales et que celles-ci se retrouvent dans l'extrait méthanolique obtenu à partir de ces germes. Or, on sait, depuis les travaux de VILKAS et coll. (394, 395) que cet extrait contient plusieurs inosito-phospholipides, dont certains sont liés à des glucides.

Le pouvoir oncolytique semble donc lié à des phosphoglycolipides; mais on ne connaît pas pour l'instant, d'une façon précise, la structure des sites actifs. Ce problème ne sera résolu que lorsqu'on aura pu isoler à l'état pur des fragments moléculaires relativement simples.

Il est intéressant de noter par ailleurs que l'injection intraveineuse de spores de certaines bactéries non pathogènes s'est également révélée efficace dans de nombreux cas. Mais celles-ci semblent agir par un mécanisme différent de celui des endotoxines ou du lipide A (378).

Mécanisme de l'activité antitumorale

De nombreuses hypothèses ont été avancées pour expliquer l'action antitumorale des endotoxines bactériennes. ANDERVONT et SHIMKIN (396) ont pensé que l'endotoxine pouvait abaisser le taux d'acide ascorbique au niveau de la tumeur et favoriser la nécrose hémorragique de cette dernière par rupture des capillaires. En fait, l'administration d'acide ascorbique n'inhibe pas l'activité oncolytique de l'endotoxine (80). Les expériences effectuées pour montrer une intervention possible de l'histamine n'ont apporté également que des résultats négatifs (397, 398). On a cru aussi que l'hémorragie intratumorale pouvait être due à un shock anaphylactique provoqué par les substances d'origine bactérienne (cf. 369). SCHWARTZMAN (399), en particulier, a fait une étude approfondie des relations existant entre cette

hémorragie et le phénomène qui porte son nom. En fait, la nécrose des tumeurs a pu être observée chez des souris qui résistent au phénomène de SCHWARTZMAN (209). Il est d'ailleurs apparu que l'hémorragie au niveau de la tumeur ne s'accompagne pas nécessairement d'une regression de cette dernière (209) et que diverses substances peuvent provoquer le premier de ces phénomènes sans induire le second (369). Inversement, certains produits, comme des extraits de rate de souris, peuvent provoquer une regression complète des tumeurs du sarcome 180 alors qu'aucun symptôme hémorragique n'a été observé (400).

De plus en plus, on vient à penser aujourd'hui que l'action inhibitrice des endotoxines s'exerce directement au niveau des cellules cancéreuses elles-mêmes (401, 209). Toutefois, le mécanisme de cette action demeure inconnu. En effet, s'il est bien établi que l'endotoxine stimule la glycolyse cellulaire à la manière de l'insuline (287, 288), on ne voit pas comment ce phénomène inhiberait le développement des cellules cancéreuses où la glycolyse est particulièrement intense.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I

PREPARATION DE LA FRACTION LIPIDIQUE A_{II}

CULTURE DES BACTERIES

La bactérie utilisée est la souche 0-90I d'Eberthella typhi, que l'on sait exempte d'antigène Vi, peu riche en antigène H, et dont la composition antigénique O est IX, XII_I, XII₂, XII₃.

Les méthodes de culture que nous avons utilisées précédemment au laboratoire (58,59) ne nous permettant pas de disposer de quantités suffisantes de bactéries, nous avons eu recours à l'Institut Mérieux de Marcy-l'Etoile (Rhône) qui nous fort obligeamment préparé un stock de 3 kg 600 de germes (poids sec).*

Les différentes étapes de la fabrication ont été les suivantes :

I) Préparation du milieu pour boîtes de Roux :

- Peptone bactériologique UCLAF	20 g.
- Extrait de viande Liebig	5 g.
- Agar-agar en flocons	25 g.
- Eau distillée	1000 ml.

Mettre les deux premiers constituants dans l'eau distillée. Faire bouillir. Ajouter l'agar-agar en pluie. Agiter jusqu'à dissolution complète. Ajuster le pH à 7,4 à l'aide d'une solution aqueuse à 50 p.100 de Na OH. Répartir dans des boîtes de Roux, à raison de 150 ml par boîte. Stériliser 20 minutes à 120°C. Refroidir à plat.

* Nous adressons nos vifs remerciements à Mr. R. DONIKIAN et aux personnes de son service qui nous ont apporté une aide très précieuse pour la culture des bactéries.

2) Préparation de l'eau peptonée stérile :

- Peptone bactériologique UCLAF	50 g.
- Eau distillée	1000 ml.

Dissoudre à chaud. Ajuster le pH à 7,4. Répartir dans des bouteilles de un litre. Précipiter à 120°C pendant 20 minutes. Filtrer puis distribuer dans des tubes à essais. Stériliser à 115°C pendant 20 minutes afin d'éviter une nouvelle précipitation.

3) Préparation du milieu pour culture industrielle :

Après plusieurs essais, nous avons porté notre choix sur le milieu de culture suivant, qui nous a donné le meilleurs rendement.

a) - Hydrolysate de caseine *	10 g.
Extrait de levure **	5 g.
Glucose officinal	10 g.
Chlorure de magnésium, 6 H ₂ O	200 mg.
Chlorure de manganèse, 4 H ₂ O	20 mg.
b) - Phosphate monopotassique anhydre	1,875 g.
Phosphate disodique, 12 H ₂ O	18,100 g.
c) - Eau déminéralisée	1.000 ml.

Pour la fabrication industrielle de lots de 800 litres de milieu, nous avons d'abord préparé des solutions mères huit fois plus concentrées en

* Industrie Biologique Française, 35 à 49 quai du Moulin-de-Cage, Genevilliers (Seine)

** "Yeast extract Difco", O.S.I. 141, rue de Javel, Paris XV°.

dissolvant à part les produits de la série a dans 70 litres d'eau déminéralisée et ceux de la série b dans 30 litres d'eau déminéralisée. Les solutions concentrées a et b sont mélangées extemporanément au moment de la dilution, afin d'éviter une précipitation de phosphates alcalino-terreux qui provoquerait un colmatage des filtres lors de la stérilisation.

La stérilisation est réalisée à froid, par filtration sous pression sur une batterie de filtres Seitz à plaques d'amiante.

Le milieu a un pH de $7,3 \pm 0,1$ à la fabrication. On le répartit dans les flacons de préculture et les bidons de culture préalablement stérilisés à l'autoclave.

4) Culture des bactéries.

Les bactéries sontensemencées sur des tubes de gélose inclinée que l'on maintient dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Le contenu du tube est alors repris dans 10 ml d'eau peptonée stérile. Après agitation, la suspension obtenue est introduite stérilement dans une boîte de Roux. Celle-ci est mise dans une étuve à 37°C pendant 24 heures, en veillant à ce que la gélose se trouve à la partie supérieure.

On ajoute alors dans la boîte de Roux 20 ml d'eau peptonée stérile et on agite pour bien décoller les germes, en y mettant au besoin quelques billes de verre stérilisés. A l'aide d'une grande pipette Pasteur stérile, on prélève la suspension bactérienne que l'on introduit stérilement dans le ballon de préculture contenant 8 litres de milieu. On y ajoute 10 ml de suspension d'antimousse (Rhodorsil 424) * préalablement stérilisée à part dans des tubes à essais.

* Produit Prolabo n° 2I.500.

Les flacons de préculture ainsiensemencés sont placés pendant 16 h. dans une chambre étuve réglée à 34°C. Une arrivée d'air comprimé stérile assure l'agitation et l'oxygénation à l'intérieur des ballons.

A l'aide d'un répartiteur, on introduit alors stérilement 2 litres de préculture dans chacun des bidons en Inox contenant déjà 60 litres de milieu nutritif et 20 ml de suspension d'antimousse. Ces bidons sont ensuite placés dans la chambre étuve à 34°C. Une arrivée d'air stérile, par rampe d'aération située au fond des bidons, assure l'agitation et l'oxygénation de la culture.

Au bout de 24 heures, les bactéries sont récoltées par centrifugation à l'aide de centrifugeuses Sharples modèle C 5 * tournant à 14.000 tours/minute pour un débit de 30 litres/heure.

Les rotors étant pesés avant et après la centrifugation, on connaît par différence le poids de germes humides récoltés. Pour 800 litres de culture on obtient ainsi 4 kg 600 de bactéries humides correspondant à 560 g. de bactéries sèches.

PREPARATION DE LA FRACTION A_{II}.

Extraction de l'antigène somatique

L'antigène somatique est extrait en traitant les germes par une émulsion phénol-eau, à froid, suivant la technique de WESTPHAL, LUDERITZ et BISTER (52). Pour cela, les bactéries sont collectées en introduisant dans

* S.A. des Appareils Centrifuges - Brevets "Sharples"
94, rue d'Estienne d'Orves, Rueil-Malmaison (S. et O.)

les rotors de l'eau déminéralisée et des billes de verre et en agitant vigoureusement. La suspension bactérienne obtenue est diluée de manière qu'elle contienne 1,600 l. d'eau déminéralisée pour 100 g. de bactéries sèches, puis répartie dans trois flacons en polyéthylène de 10 litres et réfrigérée dans une chambre à 4°C. Dans chacun de ces flacons, qui contient environ 187 g. de bactéries (poids sec), on introduit alors 4,350 litres d'un mélange phénol-eau à 75 p.100 (soit une proportion de 2 kg. de phénol pour 650 ml d'eau distillée) préalablement refroidi à 4°C. L'émulsion est agitée vigoureusement toutes les 20 minutes pendant 2 heures et on la laisse reposer une nuit à 4°C. La décantation se faisant mal, il a fallu centrifuger le tout à 2.000 tours/minute pendant 30 minutes, afin de rompre l'émulsion. Le contenu des pots à centrifuger est remis à décanter dans des bouteilles en Pyrex de 20 litres. Après un repos de 24 heures, la séparation est très nette entre la phase phénolique inférieure, le gâteau intermédiaire et la phase aqueuse surnageante. Celle-ci est alors prélevée par siphonnage. Le contenu résiduel des bouteilles est additionné de 2,800 litres d'eau déminéralisée, agité, centrifugé puis décanté dans les mêmes conditions. La nouvelle phase aqueuse ainsi obtenue est réunie à la première, dialysée contre l'eau du robinet jusqu'à disparition de l'odeur de phénol, puis contre de l'eau déminéralisée pendant 48 heures à 4°C.

Le contenu des sacs à dialyse est alors filtré sur laine de verre pour éliminer les particules en suspension puis versé dans 6 fois son volume d'éthanol à 95°, auquel on a préalablement ajouté 35 ml de solution éthanolique saturée d'acétate de sodium par litre. On agite vigoureusement le tout et on laisse décanter le précipité blanc floconneux à - 10°C pendant 48 heures. L'acool surnageant est enlevé par siphonnage. Le précipité est séparé du reste d'alcool par centrifugation à 2.000 tours/minute pendant 30 minutes à 2°C, lavé avec de l'éthanol et de l'acétone, puis repris dans de l'eau distillée. On agite jusqu'à obtention d'une suspension homogène.

Isolement du lipide lié à partir du lipopolysaccharide.

Le but de l'opération étant d'isoler le phospholipide, nous n'avons pas cherché à purifier davantage le lipopolysaccharide qui, à ce stade, peut contenir encore des petites quantités d'acides nucléiques et d'haptène d'origine cytoplasmique. D'autre part, nous avons pensé qu'il n'était pas nécessaire d'extraire dans un premier temps les lipides non liés contenus dans notre préparation. En effet, nous avons pu constater, au cours de travaux antérieurs que le lipopolysaccharide ainsi obtenu contient très peu de substances directement extractibles par les solvants organiques; celles-ci étant essentiellement constituées de siloxanes introduits dans le milieu de culture comme antimousse (88).

Pour extraire les lipides liés, nous avons suivi la technique de WESTPHAL et LUDERITZ (91). Après dialyse contre de l'eau distillée, 1,5 l de la solution de lipopolysaccharide sont introduits dans un ballon de 5 l, additionnés d'un volume égal d'acide chlorhydrique 2N, puis portés à ébullition sous reflux pendant 30 minutes. Après refroidissement rapide sous l'eau du robinet, le précipité obtenu est séparé par centrifugation à 2.500 tours/minute pendant 30 minutes, lavé à l'eau distillée jusqu'à disparition complète des ions chlorures des eaux de lavage, puis séché sous vide en présence d'anhydride phosphorique. Il est alors finement divisé avant d'être épuisé pendant 30 minutes par du chloroforme à 35°C, sous fréquentes agitations. Après filtration de la solution chloroformique sur verre fritté, puis évaporation du solvant sous vide, on obtient un résidu sec constitué par les lipides liés, que nous désignerons, pour conserver la terminologie de WESTPHAL (91), sous le nom de "lipide A brut". Ce lipide est conservé à - 10°C en solution chloroformique et sous atmosphère d'Azote.

Rendement de la préparation.

Lors des travaux antérieurs, au cours desquels nous avons appliqué cette technique à des petites quantités de bactéries, nous obtenions 1 g. de lipopolysaccharide pour 10 g. de germes (poids sec)*. A partir de celui-ci on libérait en moyenne 150 mg de lipide A brut, ce qui faisait un rendement de 1,5 p.100 environ par rapport aux germes entiers.

Au cours de ce travail, où nous disposions de 3,600 kg de bactéries (poids sec), nous avons obtenu 28,5 g de lipide A brut, soit un rendement de 0,8 p.100 environ. Il est probable que l'extraction du lipopolysaccharide a été moins complète, compte tenu de l'importance des volumes de suspension que nous avons dû manipuler.

Fractionnement du lipide A brut.

Le lipide A brut a été fractionné par chromatographie sur colonnes d'acide silicique, suivant la technique de LEA et coll.(402) modifiée par PHILLIPS (403); toutes les opérations étant réalisées sous atmosphère d'azote. Pour cela, nous avons utilisé des séries de dix colonnes de 30 mm de diamètre intérieur, contenant chacune 30 g d'acide silicique ** préalablement activé par chauffage à 110°C pendant 12 heures et mis en suspension dans 150 ml de chloroforme ***. Les colonnes ont été lavées successivement avec 300 ml de méthanol et 450 ml de chloroforme avant d'être chargées avec

* Il est intéressant de noter que WESTPHAL et coll. (53) ont pu extraire 1,2 g de lipopolysaccharide à partir de 10 g d'Eberthella typhi 0-901, en utilisant le procédé phénol-eau à chaud.

** Silicic acid, 100 mesh "suitable for chromatographic analysis by the method of RAMSEY and PATTERSON" - Produit MALLINCKRODT n° 2847.

*** Chloroforme pur du commerce lavé à l'eau distillée, séché sur Na₂ SO₄ puis Ca Cl₂ anhydres, redistillé et additionné de 2 p.100 de méthanol.

300 mg de lipide A brut, dissous dans 90 ml de chloroforme. Le premier pic a été élué par 525 ml de chloroforme, le second par 525 ml de mélange chloroforme-méthanol : 80 : 20 (v/v), le troisième par 1.800 ml de mélange chloroforme à 1,35 p.100 d'eau distillée-méthanol : 80 : 20 (v/v), et le quatrième par 300 ml de méthanol pur. Chacune des fractions a été pesée après élimination de l'éluant par évaporation sous vide.

Comme le montre la courbe des poids obtenus en fonction du volume d'éluat, (cf. fig. 6), les quatre fractions sont bien séparées les unes des autres. Les résultats quantitatifs de ces chromatographies sont indiqués dans le tableau 5. On voit que les fractions III et IV sont de faible importance par rapport aux deux premières. Nous avons pu noter, par ailleurs, que si les valeurs trouvées pour la fraction I demeure sensiblement constante, le pourcentage relatif de la fraction II diminue au profit de celui des fractions III et IV, lorsqu'on prolonge la durée de l'opération. Ce phénomène traduit une dégradation partielle des phospholipides sur la colonne et sera discuté dans une publication ultérieure (404).

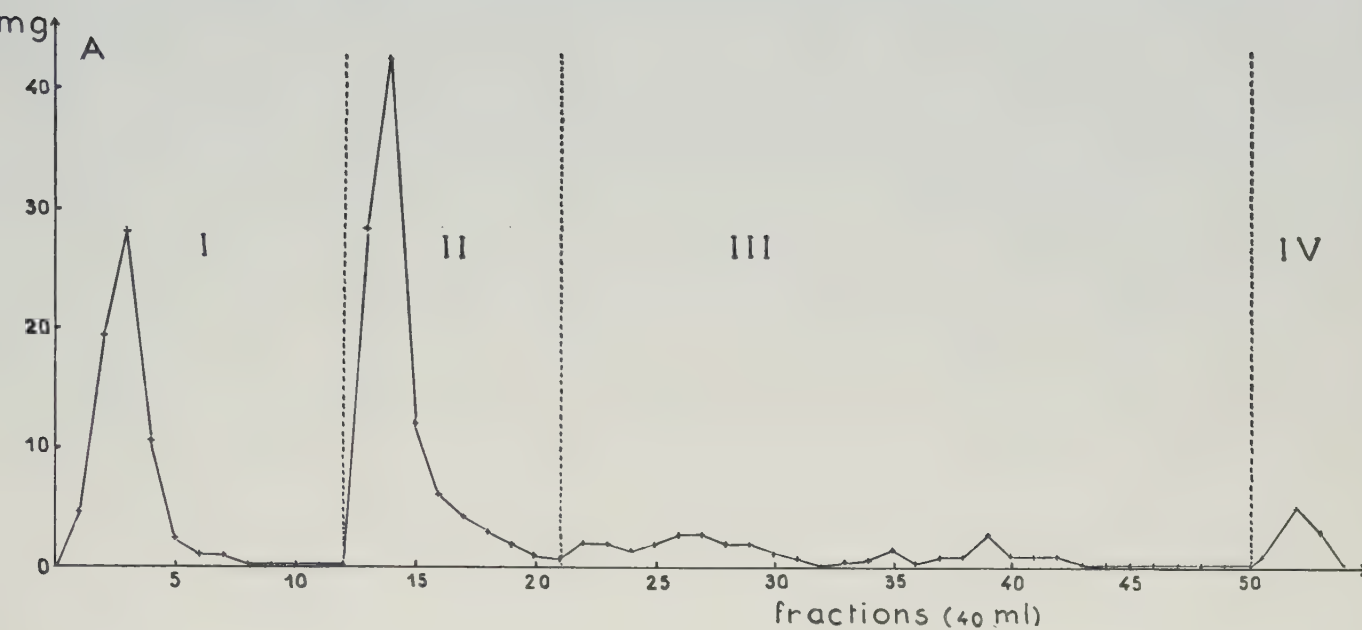


Figure 6 - Fractionnement du lipide A brut sur colonne d'acide silicique. Courbe des poids obtenus en fonction du volume d'éluat.

- Prise d'essai : 190 mg de lipide A brut - Colonne : 20 g d'acide silicique.

(La nature des éluants est indiquée dans le tableau I)

Désignation des fractions	A _I	A _{II}	A _{III}	A _{IV}
Nature de l'éluant	CH Cl ₃	CH Cl ₃ -CH ₃ OH 80 : 20	CH Cl ₃ à 1,35 % d'eau distillée - CH ₃ OH 80 : 20	CH ₃ OH
Pourcentage obtenu	35	52,8	8,2	4

Tableau 5 - Fractionnement du lipide A brut sur colonne d'acide silicique.
Pourcentages relatifs des fractions éluées.

(Les valeurs indiquées constituent une moyenne portant sur dix résultats)

C H A P I T R E I I

E T U D E P H Y S I C O - C H I M I Q U E D E

L A F R A C T I O N A_{II}

T E C H N I Q U E S A N A L Y T I Q U E S

D O S A G E D E S C O N S T I T U A N T S

I - Dosage des glucides réducteurs.

Nous avons déjà discuté, dans une thèse précédente (58), la valeur des méthodes habituelles de dosage des glucides, lorsqu'on les applique à l'analyse des constituants pariétaux des bactéries à Gram négatif. Pour le présent travail nous avons conservé les techniques qui nous avaient donné les meilleurs résultats au cours de l'étude du complexe glucido-lipido-protéinique isolé à partir de la paroi ectoplasmique de Eberthella typhi.

Les produits à analyser ont été hydrolysés dans HCl 2N au bain-marie à 100°C pendant 4 heures, leur concentration étant voisine de 0,1 p.100. On sait en effet, que l'hydrolyse chlorhydrique s'est révélée la meilleure dans le cas des glycoprotéines (405,406). Il est d'autre part bien connu que les substances à hydrolyser doivent se trouver en faible concentration afin d'éviter la formation d'humine ou une resynthèse d'oligosaccharides à partir des oses.

Nous avons vérifié que ce mode opératoire libérait peu d'hexosamines susceptibles d'interférer dans le dosage des sucres réducteurs. D'après

MONTREUIL et SCHEPPLER (406), les oses ne sont pas détruits dans ces conditions, à l'exception du fructose que l'on n'a d'ailleurs jamais identifié dans la paroi ectoplasmique des bactéries. Toutefois, la labilité des didésoxy-3,6,aldohexoses en milieu acide étant bien connue (91), nous avons recherché si, dans notre cas particulier, le tyvélose ou didésoxy-3,6-D-mannose résistait aux conditions adoptées pour l'hydrolyse. En fait, il paraît être complètement dégradé puisqu'on ne le retrouve pas sur les chromatogrammes après 30 minutes d'hydrolyse. WESTPHAL et LUDERITZ (91) avaient déjà fait une constatation semblable dans le cas de l'abéquose ou didésoxy-3,6-D-galactose.

Le dosage des fonctions réductrices libérées par l'hydrolyse acide a été effectuée par la méthode de SOMOGYI (407), en suivant le mode opératoire décrit par Mlle STAUB (408). Nous avons opéré directement sur des parties aliquotes de l'hydrolysate chlorhydrique, après neutralisation par une solution de soude et en titrant de la même façon des tubes témoins contenant les mêmes quantités d'acide chlorhydrique et de soude.

Cette méthode permet de doser entre $5 \cdot 10^{-5}$ et $15 \cdot 10^{-4}$ g de substances réductrices exprimées en glucose. L'erreur ne dépasse pas $1 \cdot 10^{-5}$ g lorsqu'on dose du glucose, mais elle est nettement plus importante dans notre cas, du fait qu'on dose en réalité un mélange de glucides dont le pouvoir réducteur varie de l'un à l'autre.

2 - Dosage colorimétrique des oses.

Afin de remédier à certains inconvénients de la méthode précédente, nous avons dosé parallèlement les oses totaux par une méthode colorimétrique spécifique ne nécessitant pas d'hydrolyse préalable. Nous avons pour cela utilisé la technique à l'anthrone décrite pour la première fois par DREYWOOD en 1946 (409) et adaptée plus tard par SCOTT et MELVIN (410). L'intensité de la coloration bleue que donnent les hexoses à chaud avec une solution sulfurique d'anthrone est déterminée à 625 mμ. On peut doser ainsi entre $3 \cdot 10^{-5}$ et $2 \cdot 10^{-4}$ g de glucides.

Nous avons vérifié que les hexosamines n'intervenaient pas dans la réaction. En revanche, bien que cette méthode soit classique, on ne sait pas dans quelle mesure les protéines et les acides aminés peuvent interférer dans la coloration.

3 - Dosage des hexosamines.

Pour ce dosage nous avons tenu compte du fait que nous n'avions trouvé que de la glucosamine dans nos produits. Toutefois, il est bon de rappeler la découverte récente, dans les endotoxines de certaines bactéries à Gram négatif, de nouvelles hexosamines où la fonction amine occupe la position 4 au lieu de la position 2 (I20). En effet, de tels glucides ne réagissent pas avec le réactif d'ELSON et MORGAN habituellement utilisé pour détecter les hexosamines et ont probablement, dans de nombreux cas, échappé aux investigations.

Nous ne discuterons pas ici les techniques de dosage des hexosamines, ce problème ayant déjà été abordé par nous mêmes (58) et, plus récemment, par DIRHEIMER (4II).

Les produits à analyser ont été hydrolysés dans HCl 6N au bain-marie à 100°C pendant 8 heures, leur concentration étant toujours voisine de 0,1 p.100. L'hydrolysate est filtré sur verre fritté pour éliminer les acides gras libres et les traces d'humine. Une partie aliquote du filtrat est évaporée dans un cristallisateur posé au dessus d'un bain-marie à 37° et placé sous un courant d'air chaud. Après dessiccation sous vide en présence de potasse et d'anhydride phosphorique, le résidu sec est repris dans un volume d'eau égal au volume primitif.

La glucosamine a été dosée par la technique de MONTREUIL (406) qui est une modification de celle de BELCHER (4I2). Elle se distingue de la méthode originale d'ELSON et MORGAN (4I3) par l'utilisation d'une solution carbonodique d'acétylacétone plus concentrée et par une colorimétrie effectuée à 510 mμ au lieu de 550. Dans ces conditions les oses et les acides aminés n'interviennent pas dans le dosage.

4 - Dosage des acides aminés.

Nous avons conservé les conditions d'hydrolyse que nous avons adoptées précédemment, après une étude systématique (58). Les différentes fractions ont donc été hydrolysées en ampoules scellées sous vide, dans HCl 6N à 100°C pendant 20 heures. Après refroidissement, les hydrolysats ont été filtrés sur verre fritté; une partie aliquote a été évaporée dans un cristalliseur et séchée sous vide, comme dans le cas des hexosamines, puis reprise dans un volume connu d'eau distillée.

Les acides aminés ont alors été dosés par la méthode de KEMBLE et Mac PHERSON (414) qui est une amélioration de celle de COHEN (415). Elle est basée sur le fait que la Chloramine T * décarboxyle les acides aminés à la température ordinaire. Cette réaction est quantitative et semble caractéristique des acides α aminés libres. Elle n'est donc pas perturbée par la présence d'hexosamines, contrairement à ce qui se passe pour les méthodes colorimétriques utilisant la ninhydrine. La réaction se faisant à 37°C, nous avons mesuré le gaz carbonique dégagé dans un appareil de WARBURG en suivant le mode opératoire de COLOBERT (416).

5 - Dosage des acides gras totaux.

Ce dosage ne pose pas de problèmes particuliers. Toutefois, la présence de fonctions amides d'acides à longue chaîne oblige à hydrolyser plus énergiquement que pour les fonctions esters. Il faut d'autre part tenir compte de l'existence d'acides hydroxylés peu solubles à froid dans les solvants non polaires.

* Sel de sodium de la paratoluène - sulfone chloramide. Produit Prolabo n°22.685. Il est nécessaire de le recristalliser deux fois avant usage. Pour cela on dissout 50 g de produit dans 100 ml d'eau distillée bouillante. On refroidit à 0°C et on filtre sur Büchner. Les cristaux sont lavés rapidement à l'eau froide et séchés sous vide.

Pour doser les acides gras du lipide A, NOWOTNY et coll. ont choisi une hydrolyse soit dans HCl 3N à 100°C pendant 10 heures (235), soit dans HCl 6N à 100°C pendant 8 heures (417), suivie d'une extraction par l'éther éthylique. KASAI et coll. (209) ont préféré l'hydrolyse dans HCl 5N à 100°C pendant 12 heures, l'extraction se faisant par ailleurs dans les mêmes conditions, tandis que BURTON et CARTER (67) ont utilisé HCl 6N pendant 6 heures sans préciser la température, les acides gras libres étant repris ensuite dans du chloroforme.

C'est cette dernière technique que nous avons adoptée, l'hydrolyse étant effectuée, pour des raisons de commodité, au bain-marie à 100°C.

Lorsque cette méthode est appliquée au lipopolysaccharide, nous avons constaté qu'il se formait des produits de dégradation des oses, solubles dans les solvants organiques, ce qui fausse le dosage gravimétrique. Pour ce constituant nous avons donc effectué une hydrolyse alcaline par ébullition sous reflux dans KOH 1,7N en solution méthanolique pendant 10 heures. L'insaponifiable a été extrait par le chloroforme en milieu alcalin tandis que les acides gras libres l'ont été après acidification par H_2SO_4 2N.

Les extraits obtenus ont été évaporés à sec, repris dans du chloroforme, filtrés sur verre fritté puis pesés après évaporation du solvant et dessiccation sous vide.

6 - Dosage des fonctions esters et amides.

Nous avons vu que dans les endotoxines les acides gras peuvent se trouver liés à la fois sous forme d'esters et sous forme d'amides. HASKINS (418) a proposé une technique qui permet le dosage différentiel de ces deux fonctions. En effet, une hydroxylaminolyse effectuée à 67°C pendant 5 minutes n'atteint que les liaisons esters, tandis que la même opération prolongée pendant 5 heures transforme tous les acides carboxyliques en acides hydroxa-

miques. Ceux-ci réagissent quantitativement avec le perchlorate ferrique pour donner une coloration pourpre, dont on détermine l'intensité à 530 mμ.

Nous avons adopté le mode opératoire de SNYDER et STEPHENS (419), modifié par TAUBER (420), en y introduisant une modification supplémentaire : 15 minutes après l'addition du réactif perchlorique, on ajoute dans chaque tube 2 ml d'eau distillée. Ceci permet d'éliminer la coloration de base due au réactif précédent et d'obtenir en même temps une coloration spécifique plus stable.

Cette méthode dose entre 1 et 5 microéquivalents d'esters, mais elle ne permet pas de faire la distinction entre les acides gras et les acides carboxyliques à chaîne courte; or, l'existence de groupements acétyles dans les endotoxines est bien connue. Aussi avons nous utilisé parallèlement la technique de DURON et NOWOTNY (417) qui consiste à effectuer dans un premier temps une transestérification quantitative de tous les acides carboxyliques par une solution méthanolique de trifluorure de bore (BF_3). Les esters méthyliques sont ensuite repris dans une quantité connue d'hexane. On dose les esters totaux sur une partie aliquote de cette solution. Une autre partie est chauffée à 67°C pendant une heure, ce qui permet d'éliminer l'acétate de méthyle sans modifier la quantité d'acides gras. Ceux-ci peuvent alors être dosés spécifiquement.

Il est intéressant de noter que dans le cas des phospholipides complexes la méthode de DURON et NOWOTNY donne des résultats plus reproductibles que l'hydroxylaminolyse directe (417).

7 - Dosages divers.

Les microdosages du carbone de l'hydrogène et de l'azote ont été effectués par le Service de Microanalyse de la Faculté des Sciences de Lyon.

Le phosphore total a été dosé par la méthode colorimétrique de FISKE et SUBBAROW (421), suivant le mode opératoire décrit par Mlle FAURE (422). Cette technique permet de doser entre $5 \cdot 10^{-6}$ et $1 \cdot 10^{-4}$ g.

IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS.

I - Séparation des acides aminés, oses et osamines.

Chacun de ces groupes de constituants ayant été libéré par une technique d'hydrolyse appropriée, il est nécessaire de le purifier avant de procéder à son analyse chromatographique. En effet, la présence d'acide chlorhydrique libre, d'ions minéraux et de produits de dégradation des protéines peut provoquer la formation de trainées sur les chromatogrammes. Pour débarrasser l'hydrolysate de ces impuretés et séparer en même temps les acides aminés des oses et des osamines, celui-ci est passé successivement sur Permolite 60 *, échangeur de cations utilisé sous forme acide, puis sur Amberlite I R A 400 **, échangeur d'anions utilisé sous forme formiate, suivant les modes opératoires décrits par BOULANGER et coll. (423) et par MONTREUIL et SCHEPPLER (406).

La Permolite 60 fixe les acides aminés et les glucides aminés. Les premiers sont élués par une solution normale d'ammoniaque, tandis que les seconds sont élués par HCl 2N (424). Ces éluats sont évaporés sous vide, repris dans une petite quantité d'eau puis lyophilisés. En revanche, les glucides ne sont adsorbés sur aucune de ces résines et se retrouvent dans l'effluent après passage sur les deux colonnes. Celui-ci est donc directement lyophilisé. D'après MONTREUIL et SCHEPPLER (406), la récupération des oses est totale dans ces conditions.

* Société PERMO, 10 Boulevard Malesherbes, Paris 8°.

** ROHM and HAAS - Philadelphia - Pennsylvania. (U.S.A.)

2 - Identification des acides aminés.

Les acides aminés ont d'abord été séparés par chromatographie unidimensionnelle sur papier Arches 302, sans lavage préalable de ce dernier. Nous avons effectué des chromatographies descendantes avec le solvant phénol-eau 100 : 10 v/v, en atmosphère saturée de HCN et de NH_4OH à 0,3 p.100.

Nous avons également procédé à des chromatographies bidimensionnelles descendantes sur papier en utilisant successivement les deux solvants suivants : phénol-eau en atmosphère saturée de HCN et de NH_4OH à 3 p.100, puis N butanol-acide-acétique-eau 4 : 1 : 5 v/v.

Les constituants ont été révélés à 90°C par une solution à 0,1 p.100 de ninhydrine dans du butanol à 5 p.100 d'acide acétique.

L'acide diaminopimelique a été recherché par chromatographie ascendante dans le système solvant de HOARE et WORK (425), méthanol-eau-HCl 10N - pyridine 80 : 17,5 : 2,5 : 10 v/v, suivie d'une révélation spécifique par la méthode de BLASS (426).

3 - Identification des oses.

Les chromatographies sur papier ont été effectuées soit sous forme descendante avec les solvants N butanol-pyridine-HCl 0,1 N 5 : 3 : 2 v/v (427) et butanol-acide acétique-eau 4 : 1 : 5 v/v (428), soit sous forme ascendante multiple (3fois) avec le solvant butanol-pyridine-eau 45 : 25 : 40 (429).

Les chromatogrammes ont été révélés par le réactif au phtalate d'aniline (430), qui donne des taches brunes après chauffage à 105°C pendant 5 minutes.

Pour la recherche du tyvélose nous avons hydrolysé le lipopolysaccharide dans H_2SO_4 0,25 N à 100°C pendant 25 minutes, suivant la technique de WESTPHAL et LUDERITZ (103). L'hydrolysate a été ensuite neutralisé par addition de carbonate de baryum puis centrifugé avant d'être étudié par chromatographie sur papier dans le solvant N butanol-pyridine-eau 3 : 2 : 1,5 v/v (141).

4 - Identification des osamines.

Nous avons déjà montré dans un travail précédent (58, 59), que l'endotoxine complète d'Eberthella typhi^{ne} contient qu'un seul glucide aminé : la glucosamine. Toutefois, nous avons recherché systématiquement l'acide muramique dans notre préparation de lipopolysaccharide, afin d'écarter l'hypothèse d'une contamination possible par les constituants de l'enveloppe interne. Pour cela, les osamines ont été étudiées par chromatographie descendante sur papier dans les solvants suivants :

- a) Butanol-acide acétique-eau 4 : 1 : 5 v/v qui donne pour la glucosamine un R_f de 0,11 et pour l'acide muramique un R_f de 0,36 (431).
- b) Phénol-eau 3 : 1 v/v qui donne pour la glucosamine un R_f de 0,36 et pour l'acide muramique un R_f de 0,49 (431).

Les chromatogrammes ont été révélés par le réactif d'ELSON et MORGAN (413) suivant la technique de PARTRIDGE (428), au nitrate d'argent ammoniacal (428), au phtalate d'aniline (430) et à la ninhydrine.

5 - Identification des acides carboxyliques.

a) Acides gras.

L'identification des acides gras a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse, après transformation en esters méthyliques. Pour l'estérification nous avons utilisé une solution méthanolique de BF_3 préparée suivant le mode opératoire de METCALFE et SCHMITZ (432), en dissolvant BF_3 gazeux * dans du méthanol pur, jusqu'à une concentration de 14 p.100 en poids. Les acides gras libres, obtenus comme nous l'avons indiqué précédemment, ont été convertis en esters par ébullition sous reflux dans ce réactif pendant 3 minutes. Après addition d'eau pour détruire l'excès de BF_3 , les esters méthyliques ont été extraits par de l'hexane.

Parallèlement, nous avons effectué une transestérification directe des acides gras en soumettant A_{II} et le lipopolysaccharide à une ébullition sous reflux dans BF_3 méthanolique pendant 6 heures. DURON et NOWOTNY (417) ont en effet montré qu'une telle durée est nécessaire pour transformer en esters méthyliques la totalité des acides carboxyliques des endotoxines.

Les conditions opératoires pour la chromatographie en phase gazeuse étaient les suivantes :

Appareil : MICROTEK GC - 2500 R **

Colonnes : en Inox de 180 x 0,635 cm.

Support solide : "Chromosorb G DMCS treated, acid washed, mesh size = 60 / 80" ***

* Vendu comprimé en cylindre d'acier par ELECTROCHIMIE - UGINE
16, rue de Monceau - Paris 8°.

** TECHMATION - 113 rue Lamarck - Paris 18°

*** JOHNS-MANVILLE - Products Corp., Celite division.

Phase stationnaire : Succinate de diéthylène glycol stabilisé *

Températures : bloc d'entrée = 250°C, colonne = 192°C

bloc de sortie = 200°C, détecteur = 195°C

Gaz vecteur : Azote avec un débit de 40 ml/min.

Détecteur : Ionisation de flamme.

Enregistreur : Servo-Riter **, I - 100 millivolts.

Prise d'essai : I. 10^{-6} ml de solution dans l'éther éthylique.

Les pics ont été repérés par rapport à ceux d'un mélange témoin d'esters méthyliques d'acides gras saturés dont le nombre d'atomes de carbone variait de C_{10} à C_{18} . Pour chacune des chromatographies on a ensuite tracé la courbe des variations du $\log_{10}$ du temps de rétention relatif au palmitate en fonction du nombre d'atomes de carbone. A l'aide de la droite ainsi obtenue, on a déterminé pour chaque pic le "nombre équivalent d'atomes de carbone" (433, 434).

b) Acides acétique et formique.

Les groupements formyles et acétyles ont été identifiés et dosés par chromatographie en phase gazeuse suivant la technique de SPINGLER et MARKERT (435), après transformation en esters méthyliques.

La transestérification a été effectuée à l'aide d'une solution méthanolique de BF_3 , en chauffant les produits à 80°C pendant six heures, dans une ampoule scellée. Celle-ci a été refroidie à 0°C avant ouverture. Nous avons utilisé pour l'analyse le même appareillage que précédemment, avec les particularités suivantes :

* Produit Microtek 79002I

** Texas Instruments Incorporated représenté par TECHMATION, 13 rue Lamarck
Paris 18°

- Colonne : en Inox de 120 x 0,635 cm
- Support solide : Chromoport XXX 60 - 80 Mesh *
- Phase stationnaire : Carbowax 1500 ** (15 : 115)
- Température : bloc d'entrée = 220°C, colonne = 55°C
 bloc de sortie = 120°C, détecteur = 170°C
- Gaz vecteur : azote avec un débit de 50 ml/min.
- Prise d'essai : 1. 10⁻⁶ ml de solution méthanolique.

SPECTROGRAPHIE INFRAROUGE

Les spectres d'absorption en lumière infrarouge ont été obtenus à l'aide d'un spectrographe LEITZ n° 150 à double faisceau, placé dans une enceinte thermostatée à 24°C où le degré hygrométrique était réglé automatiquement à 40 p.100. L'appareil était équipé d'un prisme au chlorure de sodium et la source d'émission était constituée par un filament de NERNST. Les coordonnées électroniques étaient les suivantes : 5,8 pour l'amplification, 7,2 pour l'amortissement, 3 pour le programme de fente, 0,9 ampère pour le courant reçu. Les enregistrements obtenus sont linéaires en transmission et en longueur d'onde.

Les diverses fractions lipidiques étaient dissoutes dans du chloroforme préalablement purifié suivant la technique de MORGAN et LOWRY (436) ou déposées sur un miroir d'argent conformément à la méthode de microspectrographie de FONTANGES et coll. (437). Le lipopolysaccharide était inclus dans une micropastille de bromure de potassium.

* Produit MICROTEK n° 790590

** Produit AEROGRAPH n° 84-165, 91 bis Avenue Pierre Curie, Saint-Cyr-l'Ecole
(S et O).

CHROMATOGRAPHIES SUR COUCHES MINCES.

Les chromatographies sur couches minces ont été réalisées sur plaques de verre de 20 x 20 cm recouvertes d'une couche de gel de silice G * ou de gel de silice HF 254 ** de 0,5 mm d'épaisseur, suivant la technique de STAHL (438, 439, 440), à l'aide de l'appareillage Desaga ***. Pour la préparation des gels nous avons utilisé soit de l'eau distillée, soit des solutions d'acétate de sodium ou de carbonate de sodium (233). Pour chacune des séparations nous avons essayé comparativement des plaques séchées pendant 4 heures dans une étuve ventilée à 33°C et des plaques "activées" par chauffage à 120°C pendant 2 heures. D'autre part, nous avons effectué parallèlement les séparations sur des plaques soumises à un développement préalable dans le solvant puis séchées avant la chromatographie proprement dite.

Bien que nous ayons utilisé un très grand nombre de solvants, nous n'indiquerons ici que ceux qui nous ont donné les résultats les plus intéressants. Il s'agit des systèmes suivants : chloroforme-méthanol-eau 65 : 25 : 4 (441), diisobutyl cétone-pyridine-eau 55 : 41 : 4 v/v (442).

Pour la révélation des chromatogrammes, la pulvérisation d'une solution à 0,05 p.100 de Rhodamine B dans de l'éthanol à 96°, généralement utilisée dans le cas des lipides, n'a pas donné de bons résultats; aussi nous avons fait appel à la technique de MANGOLD (443) qui consiste à soumettre ensuite les plaques à une pulvérisation de mélange sulfochromique, suivie d'un chauffage à l'étuve à 110°C. En fait, les meilleurs résultats ont été obtenus par l'usage consécutif d'une solution éthanolique à 10 p.100 d'acide phosphomolybdique (444) et de mélange sulfochromique.

Etant donné la diversité des techniques employées, nous indiquerons les conditions opératoires pour chacune des chromatographies.

* Produit Merck n° 7731

** Produit Merck n° 7739

*** C. Desaga; G.m.b.H. Heidelberg, Allemagne; concessionnaire : Ets Roucaire
21 rue des Favorites, Paris 15°.

R E S U L T A T S E X P E R I M E N T A U X

L'étude de la composition chimique de la fraction A_I a déjà fait l'objet d'une publication (88). Nous rappelons simplement qu'on y trouve 70p.100 d'un mélange d'acides gras libres, constitué essentiellement d'acides laurique, myristique, palmitique, palmitoléique et β -hydroxymyristique; et 30 p. 100 de constituants "neutres" contenant principalement des siloxanes provenant de l'antimousse qu'a été introduit dans le milieu de culture.

PROPRIETES PHYSIQUES DE LA FRACTION A_{II}

Solubilité. La fraction lipidique A_{II} se présente sous la forme d'une poudre blanche, lorsqu'elle est lyophilisée. Elle est insoluble dans l'eau, l'acétone, le méthanol, l'éthanol, l'éther et le benzène; soluble dans le chloroforme, le diméthyl formamide et la pyridine. Le produit obtenu après évaporation de ces solutions est un solide blanc jaunâtre de consistance cireuse. Il fond vers 170-180°C * en se décomposant.

* p F déterminé au tube de THIELE.

Spectre infrarouge (cf. figure 7). Le spectre infrarouge de A_{II} est formé des vibrations suivantes;

une bande d'absorption à 3.300 cm^{-1} ($3,03\text{ }\mu$) qui correspond à la vibration de valence des OH liés,

le doublet des vibrations de valence des CH antisymétriques à 2924 cm^{-1} ($3,42\text{ }\mu$) et des CH symétriques à 2849 cm^{-1} ($3,51\text{ }\mu$),

une bande d'absorption à 1718 cm^{-1} ($5,82\text{ }\mu$) qui correspond à la vibration de valence du carbonyle ($\searrow$ de $C = O$ ester),

une bande d'absorption à 1647 cm^{-1} ($6,07\text{ }\mu$) et une autre à 1543 cm^{-1} ($6,48\text{ }\mu$) correspondant respectivement aux vibrations de valence amide I et amide II de la liaison $CO - NH$,

une bande d'absorption à 1466 cm^{-1} ($6,82\text{ }\mu$) correspondant aux vibrations de déformation des groupements CH_2 du squelette carboné,

un épaulement à 1460 cm^{-1} ($6,85\text{ }\mu$) et une bande d'absorption à 1734 cm^{-1} ($7,28\text{ }\mu$) correspondant respectivement aux vibrations de déformation antisymétriques et symétriques des CH_3 ,

un massif important à 1053 cm^{-1} ($9,50\text{ }\mu$) qui peut correspondre aux vibrations de valence de $C-C$, $C-O-C$ et $C-OH$ des hydrates de carbone, mais qui peut contenir également la vibration de valence de $P-O-C$. Il existe en effet une bande à 1255 cm^{-1} ($7,97\text{ }\mu$) pouvant correspondre à la vibration de valence de $P = O$.

Le spectre de A_{II} déposé sur un miroir d'argent (spectre II) contient en outre deux autres bandes, situées respectivement à 800 cm^{-1} ($12,50\text{ }\mu$) et 719 cm^{-1} ($13,90\text{ }\mu$), correspondant aux vibrations de déformation des CH du squelette carboné.

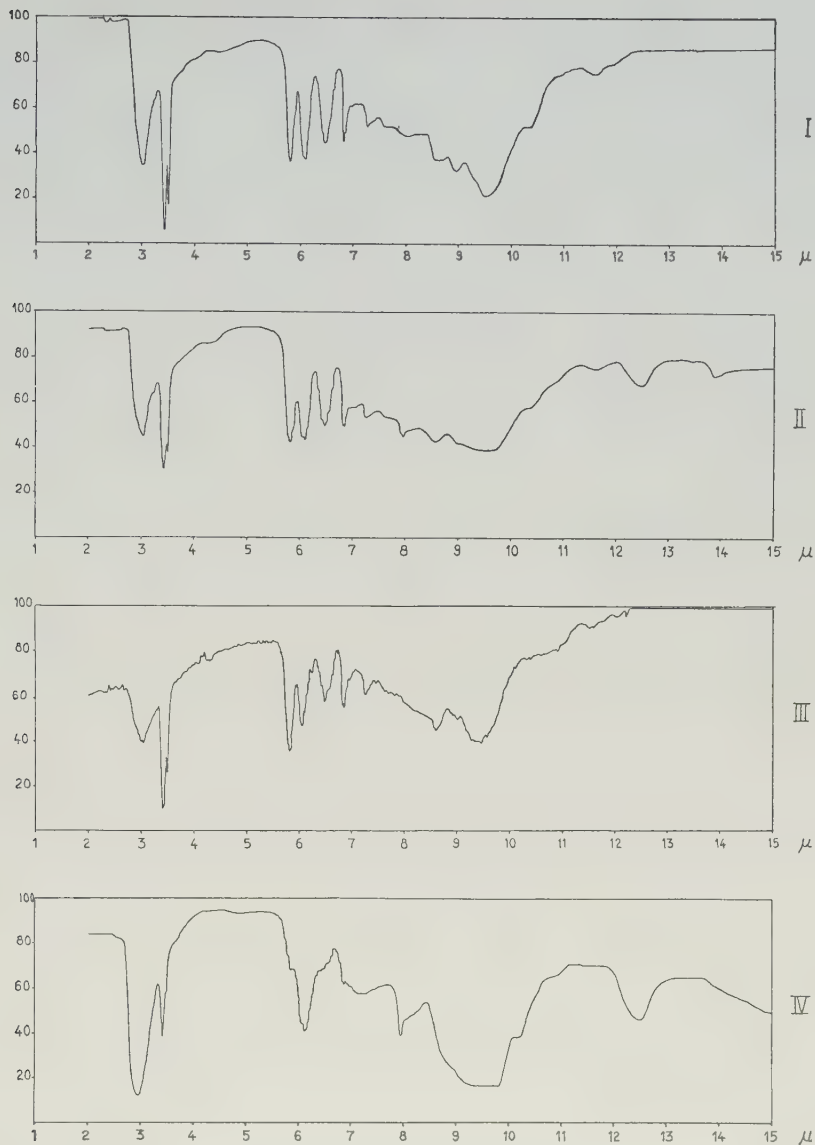


Figure 7 - Spectres d'absorption en lumière infrarouge.

- I) A_{II} , solution chloroformique à 40 g/litre en microcellule.
- II) A_{II} déposé sur un miroir d'argent.
- III) A_{II} extrait de Serratia marcescens par A.NOWOTNY, solution chloroformique à 20 g/litre en microcellule.
- IV) Lipopolysaccharide d'Eberthella typhi en pastille de KB_r .

Il est intéressant de noter qu'il existe une grande similitude, du point de vue qualitatif, entre le spectre IR de notre fraction A_{II} et celui d'une autre fraction lipidique A_{II} extraite du lipopolysaccharide de Serratia marcescens et que le Dr. NOWOTNY a bien voulu nous adresser. (spectre III). D'autre part, on retrouve les mêmes bandes d'absorption dans le spectre IR de la fraction lipidique A_{III} isolée à partir d'Escherichia coli par BURTON et CARTER (67) et dans ceux des lipides A extraits d'Escherichia coli, Shigella flexneri, Salmonella paratyphi B et Pseudomonas fluorescens par KASAI et coll. (209).

Si l'on compare au spectre IR de A_{II} , celui du lipopolysaccharide correspondant (spectre IV), on remarque les particularités suivantes,

absence de bandes d'absorption à 1718 cm^{-1} ou $5,82\text{ }\mu$ (ν de C = O ester), à 1543 cm^{-1} ou $6,48\text{ }\mu$ (δ de N-H) et à 1466 cm^{-1} ou $6,82\text{ }\mu$ (δ de CH_2),

importance relative plus grande de la bande d'absorption située à 3390 cm^{-1} ou $2,95\text{ }\mu$ (ν de OH lié), du massif situé entre 1111 et 1000 cm^{-1} ou 9 et $10\text{ }\mu$ (ν de C-C et C-O-C des glucides) et de la bande d'absorption située à 800 cm^{-1} ou $12,5\text{ }\mu$ (δ de CH du squelette carboné),

présence d'une bande d'absorption à 1258 cm^{-1} ou $7,95\text{ }\mu$ (δ de Si- CH_3) ce qui traduit, comme nous l'avons déjà démontré (88), une contamination de l'endotoxine par le siloxane antimousse introduit dans le milieu de culture.

Composition chimique de la fraction A_{II} et du lipopolysaccharide correspondant

Il nous a paru intéressant d'étudier comparativement la composition chimique de la fraction A_{II} et celle du lipopolysaccharide correspondant. En effet, bien que les méthodes chimiques soient beaucoup moins sensibles que les procédés biologiques pour détecter les traces d'endotoxine, une telle étude permet d'écarter l'hypothèse d'une contamination importante du lipide

par du lipopolysaccharide intact ou partiellement dégradé. Elle peut également mettre en évidence des différences structurales susceptibles d'expliquer la disparité des propriétés biologiques.

Les résultats de l'analyse chimique sont donnés dans le tableau 6. Il convient de noter particulièrement l'absence de groupements acétyles et formyles dans la fraction A_{II}. D'autre part, la teneur en glucides de cette fraction est extrêmement faible par rapport à celle du lipopolysaccharide. L'analyse chromatographique n'a d'ailleurs pas permis de retrouver dans le lipide les constituants glucidiques ni les acides aminés de l'endotoxine, à l'exception de la glucosamine et de l'acide aspartique (tableau 7).

Les acides gras présents dans la fraction A_{II} sont identiques à ceux du lipopolysaccharide; toutefois, leurs proportions relatives sont différentes, particulièrement en ce qui concerne l'acide palmitique. Les acides en C_{I2}, C_{I4}, C_{I6} et C_{I8} correspondent respectivement aux acides laurique, myristique, palmitique et stéarique. L'acide dont la longueur de chaîne est équivalente à C_{I5,7} n'a pas pu être identifié, vu la faible quantité de produit disponible. Quant aux acides dont la longueur de chaîne est équivalente à C_{I6,3} et C_{I9,3}, il s'agit respectivement des acides palmitoléique et β -hydroxymyristique que nous avons déjà caractérisés lors d'un travail précédent (88).

On peut noter que dans le cas de A_{II} la quantité d'acides gras extraite par le chloroforme après hydrolyse acide est supérieure à celle que l'on trouve en multipliant le nombre des fonctions esters et amides appartenant à des acides à longue chaîne, par le poids moléculaire de l'acide palmitique (P.M. = 256,42) pris comme valeur moyenne. Cette différence peut être attribuée à la présence dans l'extrait chloroformique de substances solubles qui ne sont pas des acides gras. Ceci semble confirmé par le comportement de ces substances en chromatographie sur couches minces.

Constituant dosé	Lipopolysaccharide	Fraction A _{II}
C	39,97	63,17
H	7,86	10,29
N	1,32	1,73
P	2,5	2,16
Glucides totaux (anthrone)	26,48	0,57
Glucides réducteurs (Somogyi)	32,3	6,6
Hexosamines	6,4	12,84
Acides gras	11-12	60-65
Acides aminés chloramine T	3,49	2,37
Acides aminés * N total-N glucosamine	7,64	6,82
Esters acides gras	0,51 µeq/mg	1,06 µeq/mg
Esters acides volatils	0,03 µeq/mg	0
Amides	0,15 µeq/mg	0,66 µeq/mg
Acide acétique	0,02 µ mole/mg	0
Acide formique	+	0

Tableau 6 - Composition chimique comparée du lipopolysaccharide et de la fraction lipidique A_{II}

(Sauf indication contraire, les résultats sont exprimés en pourcentages)

* Pourcentage calculé en fonction d'un poids moléculaire moyen de 120.

Substances identifiées		Lipopolysaccharide	Lipide A _{II}
Acides aminés	Ac. aspartique	+++	traces
	Ac. glutamique	+++	0
	Sérine	+++	0
	Glycocolle	+	0
	Lysine	traces	0
	Thréonine	traces	0
	Alanine	+	0
	Valine	traces	0
	Leucine	traces	0
	Isoleucine	traces	0
	Ac.diaminopimélique	0	0
Glucides	Tyvelose	+	0
	Glucose	+	0
	Galactose	+	0
	Mannose	+	0
	Rhamnose	+	0
	Ribose	0	0
	Glucosamine	+	+
	Ac. muramique	0	0

Tableau 7 - Nature des acides aminés et des oses libérés par hydrolyse acide à partir du lipopolysaccharide et de la fraction lipidique A_{II}.

T_r	LCE	Lipopolysaccharide	Fraction A_{II}
0,26	C_{I2}	21,0	22,0
0,50	C_{I4}	32,7	25,0
0,89	$C_{I5,7}$	1,8	3,3
I	C_{I6}	12,0	2,9
1,10	$C_{I6,3}$	7,9	10,9
1,93	C_{I8}	traces	traces
2,94	$C_{I9,3}$	24,5	36

Tableau 8 - Identification et dosage des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

Les résultats sont exprimés en mg d'ester méthylique pour 100 mg d'esters totaux .

T_r = temps de rétention des esters méthyliques par rapport au palmitate de méthyle sur DEGS à 192°C.

LCE : longueur de chaîne équivalente.

Etude de l'homogénéité de A_{II}

Au cours de la préparation de la fraction lipidique A_{II} , nous avons pu noter que le pourcentage relatif de cette fraction diminuait au profit de celui des fractions A_{III} et A_{IV} , lorsque l'élution des phospholipides était effectuée le lendemain du chargement de la colonne. Il y avait donc probablement une dégradation de ces lipides sur la colonne d'acide silicique. Cette constatation nous a amenés à étudier systématiquement le comportement de A_{II} sur cet adsorbant et à conclure effectivement à une dégradation de ce constituant. Il n'était donc pas possible d'utiliser de telles colonnes pour l'étude de l'homogénéité de A_{II} . Aussi avons nous cherché à fractionner celui-ci successivement sur colonnes de cellulose et de DEAE-cellulose. Le détail de ces opérations et les résultats obtenus doivent faire l'objet d'une publication ultérieure (404). Nous n'en retiendrons ici que les conclusions, à savoir que la fraction A_{II} contient plusieurs constituants phospholipidiques de compositions chimiques très voisines. Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, cette hétérogénéité est la conséquence de l'utilisation d'une hydrolyse acide pour la libération du lipide à partir du lipopolysaccharide.

Parallèlement, nous avons étudié le comportement de A_{II} en chromatographie sur couches minces d'acide silicique. Les résultats obtenus sur gel de silice ont été très décevants. En effet, bien que nous ayons essayé pratiquement tous les solvants habituellement utilisés pour la séparation des phospholipides, nous avons toujours obtenu des traînées sur les plaques. Les chromatogrammes de la figure 8 représentent les meilleurs résultats que nous ayons pu obtenir avec cet adsorbant.

A la suite des travaux de KASAI et YAMANO (233) sur le comportement de plusieurs lipides A bruts en chromatographie sur couches minces, nous avons repris l'étude de l'homogénéité de A_{II} par cette technique, en tenant compte des modifications apportées par ces auteurs pour la préparation des couches.



Figure 8 - Chromatographies sur couches minces

1) Produit déposé : A_{II}

Nature de la couche : Gel de silice G (30g) + eau (60 ml)

Epaisseur : 0,25 mm (plaque activée soumise à un développement préalable)

Solvant : diisobutylcétone-pyridine-eau 55 : 41 : 4 v/v

Révélation : Rhodamine + mélange sulfo-chromique

2) Produit déposé : A_{II} de *Serratia marcescens* (échantillon de A.NOWOTNY)

Nature de la couche : Gel de silice G (30g) + eau (60 ml)

Epaisseur : 0,25 mm (plaque activée et soumise à un développement préalable)

Solvant : Chloroforme-méthanol-eau 65 : 25 : 4 v/v

Révélation : acide phosphomolybdique + mélange sulfo-chromique.

3) Produit déposé : A_{II}

Nature de la couche : Gel de silice G (30 g) + eau (60 ml)

Epaisseur : 0,25 mm (plaque activée et soumise à un développement préalable)

Solvant : Chloroforme-méthanol-eau 65 : 25 : 4 v/v

Révélation : acide phosphomolybdique + mélange sulfo-chromique

4) Produit déposé : A_{II}

Nature de la couche : Gel de silice G (30 g) + eau (60 ml)

Epaisseur : 0,25 mm (plaque non activée soumise à un développement préalable)

Solvant : Chloroforme-méthanol-eau 65 : 25 : 4 v/v

Révélation : Acide phosphomolybdique + mélange sulfo-chromique.

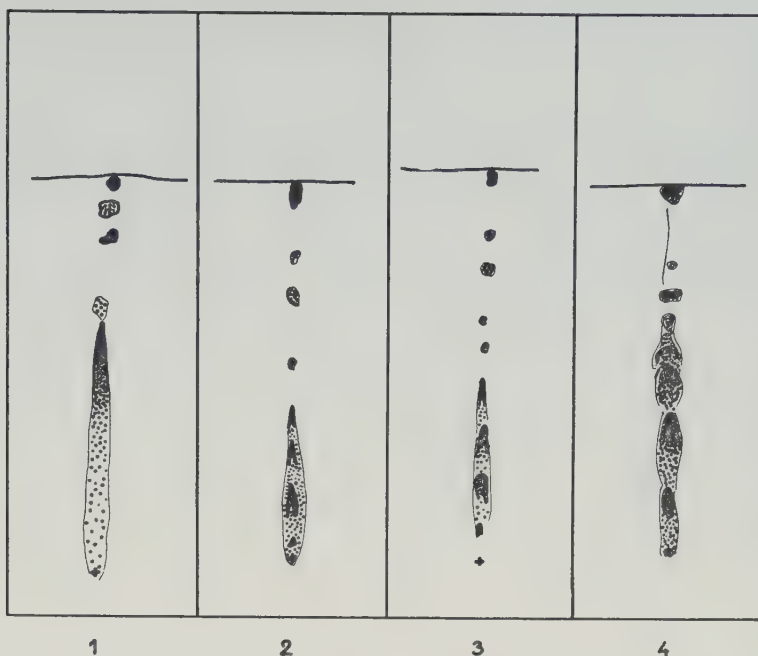


Figure 9 - Chromatographies sur couches minces (suite)

1) Produit déposé : A_{II}

Nature de la couche : Gel de silice G (50g) + CH_3COONa 0,02 M (100 ml)

Epaisseur : 0,50 mm (plaque activée)

Solvant : Chloroforme-méthanol-eau 65 : 25 : 4 v/v

Révélation : acide phosphomolybdique + mélange sulfo-chromique.

2) Produit déposé : A_{II}

Nature de la couche : Gel de silice G (50g) + Na_2CO_3 0,01M (100ml)

Epaisseur : 0,50 mm (plaque activée)

Solvant : idem.

Révélation : idem.

3) Produit déposé : A_{II}

Nature de la couche : Gel de silice G(50g) + Na_2CO_3 0,01M (100ml)

Epaisseur : 0,50 mm (plaque soumise à un développement préalable)

Solvant : idem.

Révélation : idem.

4) Produit déposé : A_{II}

Nature de la couche : Gel de silice G(50g) + sol.de Na_2CO_3 à 100g/l

Epaisseur : 0,50 mm (plaque soumise à un développement préalable)

Solvant : idem.

Révélation : idem.

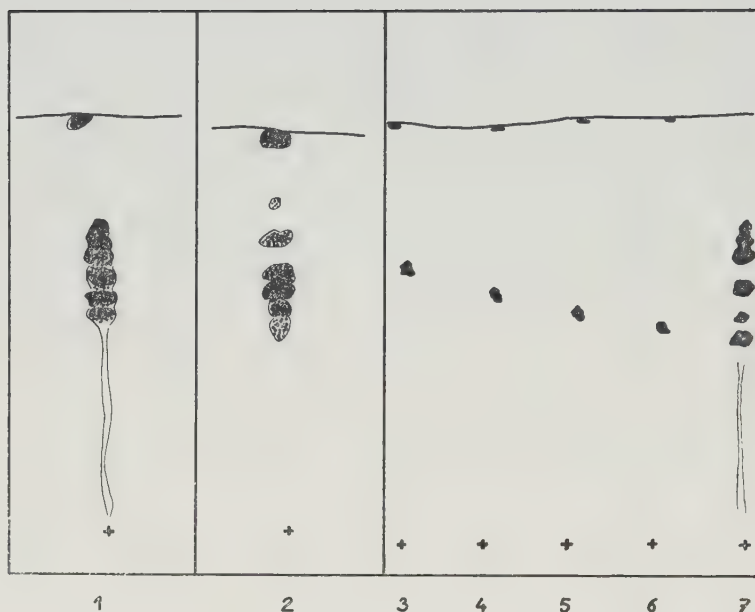


Figure 10 - Chromatographies sur couches minces (suite)

1) Produit déposé : Acides gras extraits de A_{II} après hydrolyse acide
 Nature de la couche : Gel de silice HF_{254}^{II} (50g) + sol.de Na_2CO_3 à 20 g/l (100 ml)
 Epaisseur : 0,50 mm (plaque soumise à un développement préalable)
 Solvant : Chloroforme-méthanol-eau 65 : 25 : 4 v/v
 Révélation : acide phosphomolybdique + mélange sulfo-chromique

2) Produit déposé : A_{II} (dépôt effectué sur la même plaque)

3 à 7) acide laurique, acide myristique, acide palmitique,
 acide stéarique, acides gras extraits de A_{II} après hydrolyse
 acide.

Mêmes conditions que précédemment.

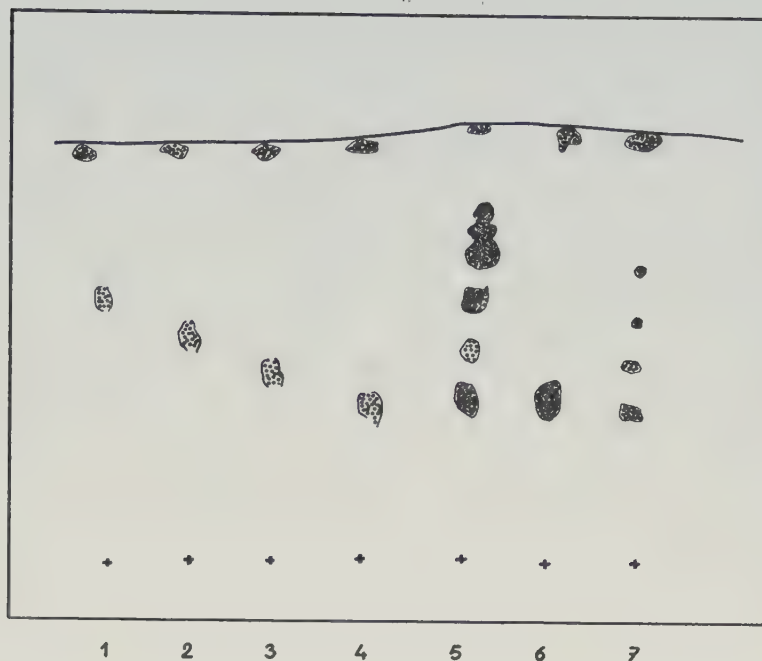


Figure II - Chromatographies sur couches minces (suite)

1) acide laurique, 2) acide myristique, 3) acide palmitique;
4) acide stéarique; 5) acides gras extraits de A_{II} après hydrolyse
acide; 6) acide β -hydroxymyristique; 7) mélange des acides gras
de C_{I2} à C_{I8}

Conditions opératoires identiques à celle de la figure IO.

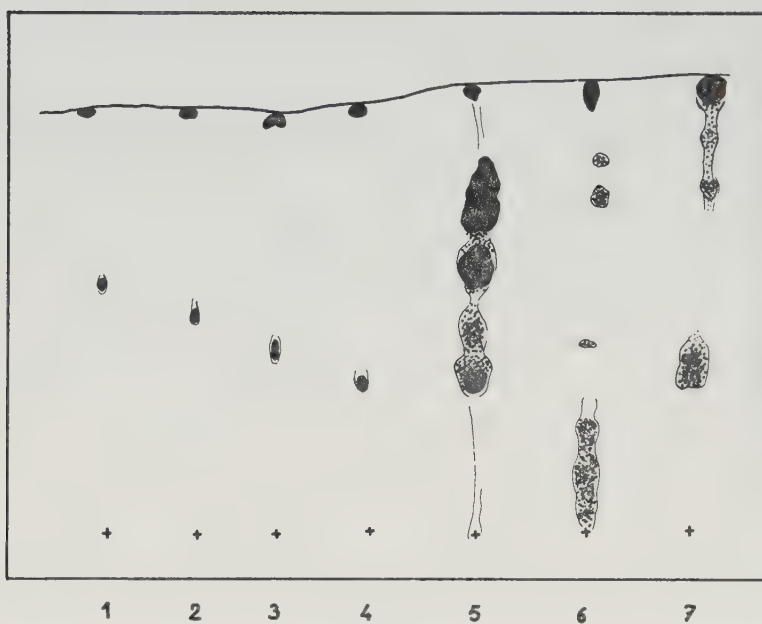


Figure I2 - Chromatographies sur couches minces (suite)

1) acide laurique; 2) acide myristique; 3) acide palmitique;
4) acide stéarique; 5) acides gras extraits de A_{II} après hydrolyse
acide; 6) A_{II} ; 7) acide β -hydroxymyristique.

Conditions opératoires identiques à celles des figures IO et II.

Les résultats obtenus sur couches de gel de silice G contenant de l'acétate de sodium (chromatogramme I de la figure 9) sont difficilement interprétables, du fait des longues traînées apparues à la révélation. L'hétérogénéité de la fraction A_{II} apparaît plus clairement lorsqu'on utilise des couches de silice contenant du carbonate de sodium (figures 9, I0 et I2), le pouvoir de résolution paraissant d'autant plus grand que la teneur des couches en carbonate est plus élevée. Toutefois, il est vraisemblable que les constituants phospholipidiques de A_{II} subissent des dégradations sur ces plaques basiques. Il existe en effet des tâches migrant au même niveau que les acides gras extraits de A_{II} après hydrolyse acide ou que ceux d'un mélange témoin contenant les acides en C_{I2} , C_{I4} , C_{I6} et C_{I8} (figures I0, II et I2). Pour chacun de ces acides gras on obtient deux taches principales, l'une migrant invariablement au front, l'autre migrant à une distance variable suivant la longueur de la chaîne hydrocarbonée. Nous avons vérifié que cette seconde tache correspondait en réalité au sel de sodium de l'acide.

C O N C L U S I O N

La fraction lipidique A_{II} est un phosphomucolipide, constitué essentiellement de résidus de glucosamine et d'acides laurique, myristique, palmitoléique et β -hydroxymyristique. Elle est dépourvue d'acides volatils et peu riche en oses et acides aminés. Bien que l'étude de son homogénéité soit rendue délicate par son instabilité, la fraction A_{II} semble contenir plusieurs phospholipides de constitution très voisine.

C H A P I T R E III

TOXICITE ET PYROGENICITE DE A_{II}

I - PREPARATION DES SUSPENSIONS INJECTABLES DE A_{II}

WESTPHAL et coll. (91, 134) ont décrit un procédé très commode pour disperser le lipide A dans un milieu aqueux. Il suffit d'introduire une solution pyridinique de ce lipide dans une solution aqueuse à 0,5 p.100 de dextran et d'éliminer ensuite la pyridine en faisant intervenir simultanément le chauffage, l'agitation et le vide.

Nous avons pensé que des injections répétées de dextran aux animaux pouvaient présenter certains inconvénients. Des accidents survenus lors de l'utilisation de solutions de dextrans comme succédanés du plasma ont en effet attiré l'attention sur le fait que ces substances possèdent des propriétés antigéniques, bien qu'étant des polyosides purs (445, 446). D'autre part, dans notre cas, cette antigénicité risquait d'être exaltée par l'association avec le lipide A_{II}, dont nous verrons plus loin les propriétés adjuvantes. C'est pourquoi, après une série d'essais préliminaires, nous avons porté notre choix sur le Subtosan * ou polyvinyl-pyrrolidone comme support hydrophyle pour la dispersion de A_{II}.

* Subtosan Retard - 25. Spécia 21 rue Jean Goujon, Paris 8°.

La suspension est préparée dans un appareil constitué d'un erlenmeyer de 500 ml, à col large, contenant un barreau aimanté et muni d'un bouchon à trois trous pour permettre la fixation d'une petite ampoule à brôme, d'une arrivée d'azote stérile et d'une sortie de l'azote (fig.I3).

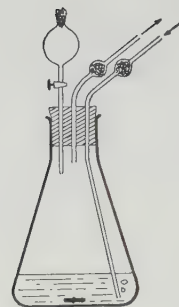


Figure I3 - Dispositif pour la préparation des suspensions injectables.

L'appareil étant stérilisé à 120°C pendant 30 minutes dans un autoclave, puis refroidi, on y introduit stérilement 250 ml d'une solution aqueuse de Subtosan à 3,5 p.100. On place ensuite l'ensemble sur un agitateur magnétique et, à l'aide de l'ampoule à brôme, on fait entrer goutte à goutte 6,25 ml d'une solution chloroformique de A_{II} à 20 mg/ml, puis on rince l'ampoule avec 1 ml de ce solvant. L'agitation étant maintenue, on fait alors barboter de l'azote stérile dans la solution jusqu'à disparition complète de l'odeur de chloroforme (environ 3 heures). La suspension homogène obtenue est congelée à -20°C et peut être conservée ainsi pendant un mois. On la décongèle au moment de l'emploi, par chauffage modéré dans un bain-marie.

Ce procédé permet de disperser jusqu'à 1 mg de A_{II} par ml de solution. Au delà de cette concentration il se forme des grumeaux.

Le même dispositif nous a servi également pour la préparation des suspensions huileuses de A_{II} . Il suffit pour cela de remplacer la solution de Subtosan par de l'huile d'olive neutralisée et stérilisée suivant le procédé du Codex (447). Cette huile présente l'avantage de permettre la dispersion de quantités plus importantes de A_{II} . Nous avons pu en effet y introduire 3 mg de A_{II} par ml, sans modifier l'homogénéité de la suspension.

II - TOLERANCE DES ANIMAUX AUX INJECTIONS DE A_{II}.

Chez le singe (Cynocephalus babuin).

Injections intraveineuses : Hormis une légère et fugace hyperthermie, l'injection de 3 mg de A_{II} a été parfaitement supportée par tous les animaux. Plusieurs lots de singes ont reçu cette dose d'une manière répétée sans qu'aucun dommage ait été constaté.

Injections sous cutanées : Nous n'avons noté aucune abscédation après injection de 3 mg de A_{II} par voie sous-cutanée. D'autre part, il nous a semblé qu'aucun signe douloureux ou inflammatoire n'est apparu par la suite.

Chez le lapin.

Injections intraveineuses : Tous les animaux ont très bien supporté des doses allant jusqu'à 1,2 mg par Kg de poids vif, même lorsque ces injections ont été répétées 5 ou 6 fois.

Injections intradermiques : Aucun phénomène inflammatoire important n'a été observé pendant les 3 jours qui ont suivi l'injection, chez des lapins albinos. D'autre part, aucun phénomène nécrotique n'est apparu après ce délai.

Chez le cobaye.

Injections intradermiques : La réaction des cobayes blancs ayant reçu une injection est tout à fait comparable à celle des lapins.

III - RECHERCHE DE LA DOSE LETALE POUR LA SOURIS.

Injection unique

La dose létale a été recherchée sur des souris BALB/c âgées de 5 semaines et pesant entre 20 et 22 grammes. Ces souris étant réparties en 5 lots de 10 animaux, on a injecté à chacune d'entre elles, par voie intrapéritonéale, 1 ml de suspension huileuse de A_{II} contenant 0,25, 0,50, 1, 2 ou 3 mg de lipide, suivant le lot. Parallèlement, 10 souris témoins ont reçu, par la même voie, 1 ml d'huile ne contenant pas de A_{II} . Les animaux ont été observés pendant 15 jours et pesés quotidiennement. Tous ont survécu à l'injection, mais, à l'exception des témoins, ils ont accusé une perte de poids de 2 g en moyenne au bout de 24 heures et n'ont retrouvé leur poids initial qu'après un délai d'une semaine.

Il est intéressant de noter que la DL_{50} du lipopolysaccharide extrait d'Eberthella typhi par le procédé phénol-eau et injecté à des souris de 20 g par voie intrapéritonéale est de $160. 10^{-6}$ g (57)..

Injections quotidiennes

Trois lots de 10 animaux ont reçu respectivement des injections quotidiennes de $250. 10^{-6}$, $100. 10^{-6}$ et $25. 10^{-6}$ g de A_{II} , dispersé dans 0,5 ml d'huile d'olive, pendant 10 jours. Parallèlement, on a injecté quotidiennement 0,5 ml d'huile sans A_{II} à 10 souris d'un lot témoin.

Les souris témoins et celles qui avaient reçu $25. 10^{-6}$ ou $100. 10^{-6}$ g de A_{II} ont toutes survécu après l'expérience. Celles qui avaient reçu $250. 10^{-6}$ g sont mortes après la deuxième injection. Elles présentaient un phénomène de shock intense dans les heures qui ont suivi celle-ci.

IV - PROPRIETES PYROGENES DE A_{II}

Principe de la mesure

Nous ne discuterons pas ici les différentes manières d'exprimer la relation existant entre la dose de substance pyrogène et la réponse fébrile (cf. page 42), ce problème ayant été étudié récemment par KEENE et coll. (448). Ces auteurs ont montré qu'au lieu de rechercher la dose minimale pyrogène (DMP), qui est la dose nécessaire pour produire une augmentation de température de 0,6°C chez le lapin, il est préférable de mesurer la surface comprise entre la courbe thermique expérimentale et la courbe thermique moyenne du lapin. On définit ainsi un "indice de fièvre" Fi 40 qui correspond à une surface de 40 cm², lorsqu'on porte en abscisses le temps en heures et en ordonnées la température en degrés centigrades, sur un papier dont l'échelle est graduée en pouces. Pour des raisons évidentes de commodité, nous avons utilisé du papier millimétré. A l'indice Fi 40 correspond alors approximativement une surface de 6,2 cm².

MATERIEL ET METHODES

Lapins. Nous avons utilisé des lapins mâles ou femelles de race commune pesant entre 2 et 3 Kg, placés dans des cages individuelles et maintenus à un régime complet et uniforme pendant une semaine. Quinze jours avant leur utilisation, nous avons vérifié que ces animaux présentaient une sensibilité normale à l'égard des substances pyrogènes.

Matériel. Les seringues et aiguilles ont été lavées soigneusement, rincées avec de l'eau distillée apyrogène et stérilisées à 250°C pendant 45 minutes.

Thermomètres. Les prises de températures ont été effectuées à l'aide de thermomètres "pour cobayes" gradués en degrés Fahrenheit, ce qui nécessite

une transformation en degrés centigrades. Les thermomètres ont été introduits chaque fois à la même profondeur, la longueur optimale étant fixée à 5,5 cm. Ils ont été maintenus en place pendant 3 minutes.

Techniques de l'essai. Avant l'expérimentation, nous avons pris la température de tous les animaux, y compris celle des lapins témoins, de 9 heures à 18 heures, pendant deux jours consécutifs.

Pour chacune des doses expérimentées, nous avons utilisé des lots de 3 animaux au minimum et un lapin témoin qui a reçu 1 ml de solution à 3,5 p.100 de Subtosan par Kg de poids vif. Cette solution a été préparée comme la suspension de A_{II} ; mais on a remplacé la solution chloroformique de lipide par du chloroforme pur. Les injections ont été effectuées dans la veine marginale de l'oreille.

R E S U L T A T S

Des expériences préliminaires nous ont permis de voir que des doses de $0,01. 10^{-6}$, $0,1. 10^{-6}$, $1. 10^{-6}$, $10. 10^{-6}$ et $100. 10^{-6}$ g par Kg de poids vif n'avaient aucun effet visible.

Pour un même échantillon de A_{II} , l'effet pyrogène augmente en fonction de la dose injectée. Au cours d'une expérience nous avons obtenu par exemple :

- 3,07 cm ²	pour	$200. 10^{-6}$ g/Kg
- 4,45 cm ²	pour	$400. 10^{-6}$ g/Kg
- 5,33 cm ²	pour	$600. 10^{-6}$ g/Kg.

Toutefois, l'effet pyrogène varie assez sensiblement d'un échantillon à l'autre. C'est ainsi que pour un autre échantillon de A_{II} nous avons obtenu une surface moyenne de 3,40 cm² pour une dose de $1000. 10^{-6}$ g/Kg.

C O N C L U S I O N

Quelles que soient les variations observées d'un échantillon à l'autre, on peut conclure que la fraction lipidique A_{II} est faiblement pyrogène. En effet, nous n'avons jamais pu obtenir une surface de 6,2 cm² correspondant à l'indice Fi 40, même avec des dose supérieures à 1 mg/Kg. A titre de comparaison, l'endotoxine nous a donné cet indice à la dose de $0,1 \times 10^{-6}$ g/Kg, c'est à dire avec une dose plus de 10.000 fois plus faible.

C H A P I T R E I V

RECHERCHE D'UNE ACTION EVENTUELLE DE A_{II} SUR L'IMMUNITE SPECIFIQUE

Il était particulièrement intéressant de rechercher si l'injection de A_{II} pouvait induire chez l'animal la formation d'anticorps spécifiques de l'antigène somatique O. En effet, la présence de tels anticorps aurait traduit une contamination du lipide par des petites quantités d'antigène somatique non décelables par les méthodes chimiques. On pouvait également se demander si la fraction lipidique A_{II} possédait elle-même des propriétés antigéniques. Aussi avons nous recherché dans le sérum des animaux ayant reçu A_{II} par voie intraveineuse la présence d'anticorps spécifiques de ce lipide.

I - RECHERCHE DE LA PRESENCE EVENTUELLE D'ANTICORPS AGGLUTINANTS ANTISALMONELLES APRES L'INJECTION DU LIPIDE A_{II}.

Les prises de sang effectuées chez les singes pour doser le taux d'obstine après injection de A_{II} ont servi également pour la recherche des anticorps spécifiques de l'antigène O. Le titrage a été réalisé suivant la méthode classique d'agglutination des bactéries, avec les modalités opératoires décrites par DUMAS (449), l'antigène utilisé étant la souche O-90I d'Eberthella typhi.

Nous n'avons jamais pu mettre en évidence d'anticorps agglutinants spécifiques vis à vis de cette souche bactérienne dans les différents sérums étudiés.

II - RECHERCHE DES ANTICORPS SPECIFIQUES VIS A VIS DE LA FRACTION LIPIDIQUE A_{II}

M O D E O P E R A T O I R E

Nous avons recherché les anticorps spécifiques vis à vis de la fraction A_{II} par déviation du complément, en utilisant pour cela la technique de KOLMER et BOERNER (450) qui consiste à apprécier une hémolyse 100 p.100 à froid. Nous avons préalablement titré notre antigène (A_{II}) par la technique de BOERNER et LUKENS (451). Les modalités opératoires adoptées étaient celles qui ont été décrites par LEPINE et SOHIER (452). Les produits servant à la réaction étaient les suivants.

- Antigène : fraction lipidique A_{II} dispersée dans une solution à 3,5 p.100 de Subtosan, à raison de 1 mg/ml.
- Sérums : sérums de trois singes (Cynocephalus babuin) adultes ayant reçu chacun 3 injections de 3 mg de A_{II} à une semaine d'intervalle, la prise de sang étant effectuée 7 jours après la dernière injection.
- Complément sec de l'Institut Pasteur * pour les réactions de fixation du complément.
- Sérum hémolytique de l'Institut Pasteur *
- Suspension d'hématies de mouton à 2 p.100 de culot.

* Institut Pasteur - 36, rue du Docteur Roux, Paris 15°.

R E S U L T A T S

a) Les titrages "du jour" du complément ont montré que la solution à 3,5 p.100 de Subtosan avait un net pouvoir anticomplémentaire. Celui-ci est encore plus marqué lorsque la solution de Subtosan contient 1 mg de A_{II} par ml.

b) Les réactions de déviation du complément ont été mises en oeuvre avec six dilutions différentes d'antigène : 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 et six dilutions différentes de sérum : 1/2,5, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80.

Lorsqu'on observait une hémolyse totale dans les témoins généraux, c'est à dire le témoin sérum, le témoin antigène et le témoin couple hémolytique, nous avons constamment obtenu une hémolyse totale dans l'ensemble des tubes de la réaction.

Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence la présence d'anticorps anti A_{II} par la technique de déviation du complément.

C O N C L U S I O N

La fraction lipidique A_{II} ne possède pas de propriétés antigéniques chez le singe (Cynocephalus babuin). En revanche, elle manifeste, in vitro, un pouvoir anticomplémentaire très net.

C H A P I T R E V

INFLUENCE DE A_{II} SUR LE TAUX D'OBSISTINE CHEZ LE SINGE

En 1960, COLOBERT et KIRN (326-327) ont mis en évidence l'existence dans le sérum de sujets humains normaux d'un facteur bactériolytique puissant capable de dissoudre une suspension épaisse d'entérobactéries diverses et aussi de vibrions cholériques. Ce facteur, pour lequel ils ont proposé provisoirement le nom d'obsistine, est un système complexe mettant en jeu au moins quatre substances de nature protéinique individuellement inactives. Il paraît être différent du complément, des anticorps, de la synergie complément-anticorps, de la properdine et de tous les facteurs antibactériens du sérum décrits jusqu'à présent.

Ce système lytique existe également dans le sérum des singes Cynocephalus babuin. D'autre part, chez ces animaux, l'obsistine participe à la réaction de l'organisme au cours de la vaccination contre les salmonelloses, d'une manière analogue mais non parallèle à celle des anticorps agglutinants et du pouvoir de séroprotection contre l'infection expérimentale de la souris (453). Le titre de l'obsistine atteint son maximum dix jours après la troisième injection vaccinale et se retrouve à sa valeur initiale trois mois et demi environ après celle-ci. A ce moment, l'ingestion de salmonelles vivantes provoque une montée du taux d'obsistine dans le sérum, cette montée étant plus intense et plus précoce chez les animaux antérieurement vaccinés que chez les animaux témoins non vaccinés.

Sachant que le lipide A semble être responsable de l'activation de l'immunité non spécifique observée après l'injection d'endotoxine, il nous a paru intéressant de rechercher si l'injection intraveineuse du lipide A_{II} modifiait la teneur en obsistine du sérum des singes.

MATERIEL ET METHODES

Titrage de l'obsistine.

Ce titrage est rendu difficile par l'interférence de divers facteurs du sérum. Ainsi, lorsqu'on suit la lyse d'une suspension d'Eberthella typhi souche 0-90I dans les conditions optima (COLOBERT et KIRN (326)), on constate que celle-ci ne débute pas immédiatement après l'addition du sérum, mais après un certain temps de latence, variable d'un sujet à l'autre. Pour titrer l'obsistine, il est nécessaire de diluer suffisamment le sérum pour que cet effet devienne négligeable. De fait, comme l'ont déjà indiqué COLOBERT et KIRN (453), on trouve ordinairement une zone de dilutions où se manifeste une proportionnalité entre l'intensité de la lyse mesurée au bout d'un temps donné et la quantité de sérum utilisée. La pente de la droite représentative, c'est-à-dire la quantité de bactéries détruites au bout d'un temps unité par un volume unité de sérum, peut servir de mesure relative du titre en obsistine. Dans la technique primitive décrite par COLOBERT et KIRN (453), on commence par réaliser une suspension d'Eberthella typhi souche 0-90I dans un tampon phosphate 0,066 M de pH 7,2 *, les bactéries étant récoltées après culture de seize heures à 37°C sur gélose nutritive inclinée.

L'opacité de la suspension bactérienne est ajustée de telle manière que la densité optique de cette suspension, diluée au 1/4 dans le tampon et mesurée à 700 mμ dans une cuve de 1 cm d'épaisseur, soit égale à 0,83.

Dans une série de tubes à essais, on distribue respectivement 0,10, 0,20, 0,25, 0,30, 0,40 et 0,50 ml de sérum à étudier. On complète à 3 ml à l'aide du tampon phosphate 0,066 M de pH 7,2. On place dans un thermostat à 37°C le flacon contenant la suspension bactérienne et les six tubes contenant les dilutions de sérum. Lorsque l'équilibre de la température est réalisé, on ajoute 1 ml de la suspension bactérienne dans chacun des tubes. Au bout de trente minutes exactement, on agite et on lit la densité optique.

* $\text{Na}_2 \text{H PO}_4$, $\text{I}_2 \text{ H}_2 \text{ O}$ = 16,717 g; $\text{KH}_2 \text{ PO}_4$ = 2,723 g pour un volume de 1 l.

Celle-ci doit être égale à 0,78 dans le tube témoin n'ayant pas reçu de sérum*. Sur un papier millimétré, on porte en abscisses les volumes de sérum utilisés et en ordonnées les densités optiques correspondantes lues à la trentième minute. Habituellement, tous les points obtenus ne sont pas alignés, mais il est en général possible de trouver trois ou quatre points consécutifs alignés permettant de tracer la droite. S'il n'en est pas ainsi, on doit reprendre le titrage avec des volumes de sérum plus faible : 0,02, 0,05, 0,10, 0,20, 0,25 ml. Sauf dans des cas exceptionnels, on observe au moins trois points consécutifs alignés permettant de tracer la droite (fig. I4).

On calcule alors la pente de la droite en faisant le rapport, pour une quantité donnée de sérum, de la diminution d'opacité exprimée en densité optique par cette quantité de sérum exprimée en millilitres. Pour éviter que les valeurs ainsi obtenues soient trop petites, on multiplie le résultat par un coefficient égal à 10. Si μ_1 représente la densité optique à la trentième minute correspondant à un volume en millilitres v_1 de sérum et μ_2 la densité optique correspondant à un volume v_2 , le titre T est donné par la formule :

$$T = \frac{\mu_1 - \mu_2}{v_2 - v_1} \times 10$$

A titre d'exemple, sur la courbe A de la figure 1 on lit que pour 0,2 ml de sérum la densité optique correspondante est de 0,73. Pour 0,5 ml de sérum, elle est de 0,52. La diminution de la densité optique

due à la lyse par l'obsistine est donc de $\frac{0,73 - 0,52}{0,5 - 0,2} = 0,7$

En multipliant cette valeur par 10, on obtient le titre du sérum, égal ici à 7 unités/ml.

* 60 divisions du tambour du photomètre tricellule Jobin et Yvon.

Dans le cas de la courbe B de la figure 1, en lisant par exemple les densités optique correspondant aux valeurs 0,3 et 0,1 ml de sérum,

$$\text{on trouve : } \frac{0,75 - 0,23}{0,3 - 0,1} \times 10 = 26 \text{ unités/ml.}$$

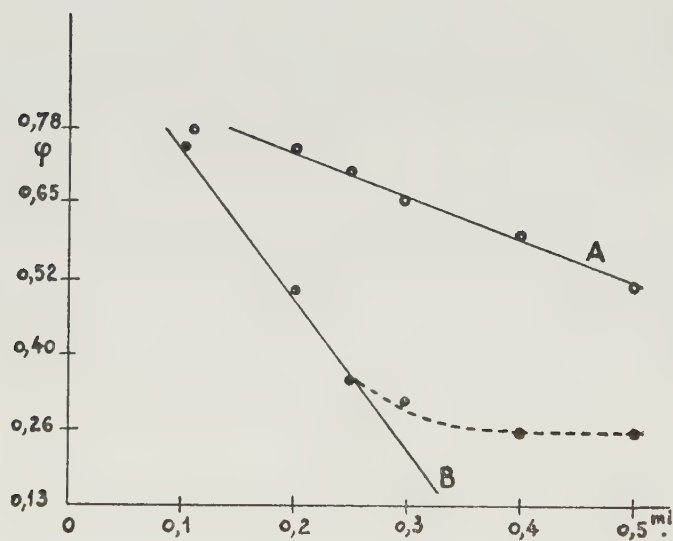


Figure I4 - Titrage de l'obsistine. En abscisses, le volume de sérum introduit dans le milieu réactionnel. En ordonnées, la densité optique de la suspension bactérienne au bout de trente minutes à 37°C.

Dans la pratique, COLOBERT et KIRN (327) ont porté en abscisses, non pas la densité optique, mais des valeurs proportionnelles aux densités optiques, lues directement sur le cadran du photomètre (photomètre tricellule Jobin et Yvon).

Le dosage consiste donc à introduire dans une suspension de bactéries, réalisée dans des conditions normalisées, des quantités croissantes de sérum sanguin et à déterminer au photomètre la quantité de bactéries lysées après maintien du mélange réactionnel pendant trente minutes à 37°C.

Modifications apportées à la méthode originale.

- I) Appareillage. Il nous sembla particulièrement intéressant de pouvoir étudier la lyse d'Eberthelle typhi 0-90I du point de vue cinétique. Mais il fallait pour cela établir la courbe de la lyse en s'appuyant sur un très grand nombre de points. Les quantités de sérum disponibles étant limitées, nous avons donc décidé d'utiliser le microspectrocolorimètre BECKMAN-SPINCO *, ainsi que des micropipettes de précision.

Alors que la méthode précédente exigeait au minimum 2 ml de sérum pour remplir 6 tubes, cette nouvelle technique permet d'effectuer 15 à 16 mesures avec la même quantité de sérum. D'autre part, l'emploi des micropipettes confère une précision plus grande aux mesures volumétriques. Enfin, l'utilisation du microspectrocolorimètre en échelle d'absorption donne des résultats très reproductibles.

- 2) Opacité de la suspension bactérienne. Dans la technique originale, la densité optique de la suspension bactérienne utilisée était égale à 0,78, soit 60 divisions du tambour du photomètre tricellule Jobin et Yvon, après dilution au quart dans le tampon. Une telle suspension correspond à environ 0,52 sur l'échelle d'absorption du microspectrocolorimètre BECKMAN-SPINCO. Afin de faciliter les mesures, nous avons décidé d'ajuster la densité optique de la suspension à 0,50.

* BECKMAN INSTRUMENTS FRANCE, 71, rue Marx Dormoy - Paris 18°

- 3) Mise en oeuvre de la réaction. Les dilutions de sérum sont réalisées dans des petits tubes à hémolyse, comme il est indiqué dans le tableau 9. Ces tubes sont placés dans un bain-marie à 37°C pendant 10 minutes. On ajoute alors dans chacun d'entre eux 200 µl de la suspension bactérienne préalablement portée à la même température. Après avoir été soigneusement agités puis bouchés, afin d'éviter toute évaporation, les tubes sont remis au bain-marie pendant 1 heure. On mesure alors la densité optique des suspensions à 650 mµ à l'aide du spectrocolumètre, après avoir eu soin d'agiter de nouveau chacun des tubes.

Tampon	595	590	585	580	560	540	520	500	480	460	440
sérum	5	10	15	20	40	60	80	100	120	140	160 etc.
Suspension											
bactérienne	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200

Tableau 9 - Réalisation de la gamme. (Les volumes sont exprimés en µl)

- 4) Expression des résultats.

a) Représentation graphique.

La courbe représentative de la diminution de la densité optique de la suspension bactérienne, en fonction de la quantité de sérum ajoutée, a l'allure d'une sigmoïde (cf. fig. 15).

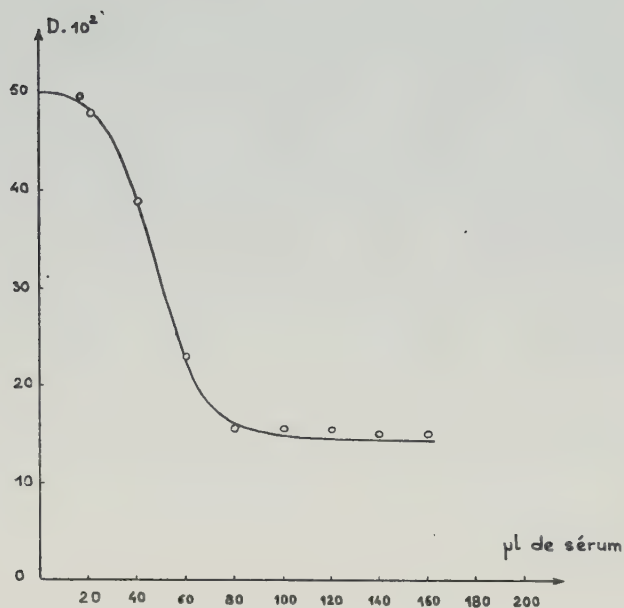


Figure I5 - Variations de la densité optique de la suspension bactérienne en fonction de la quantité de sérum ajoutée. (sérum humain - lecture effectuée après 30 minutes au bain-marie). - En ~~ab~~scisses la quantité de sérum ajoutée exprimée en µl; en ordonnées la densité optique multipliée par 100.

b) Variations des tracés en fonction du titre des sérums en obsistine.

Effet des dilutions de sérum.

Afin de connaître l'allure des courbes pour des sérums ayant une teneur en obsistine moyenne ou faible, nous avons dilué un échantillon de sérum et réalisé une série de tubes pour chacune de ces dilutions. En partant par exemple d'un échantillon de sérum humain, nous avons établi la courbe pour le sérum pur, puis pour le sérum dilué au $\frac{4}{5}$, au $\frac{3}{5}$, au $\frac{2}{5}$ et au $\frac{1}{5}$.

La figure I6 montre que la pente à l'origine de la sigmoïde tend vers l'horizontale lorsqu'on dilue le sérum, donc lorsque le taux d'obsistine baisse. Toutes les courbes obtenues conservent cependant l'allure d'une sigmoïde, sauf celle qui correspond à la dilution 1/5, c'est à dire à une faible teneur en obsistine. Il sera donc possible de diluer les sérums ayant un titre très élevé pour obtenir un tracé utilisable.

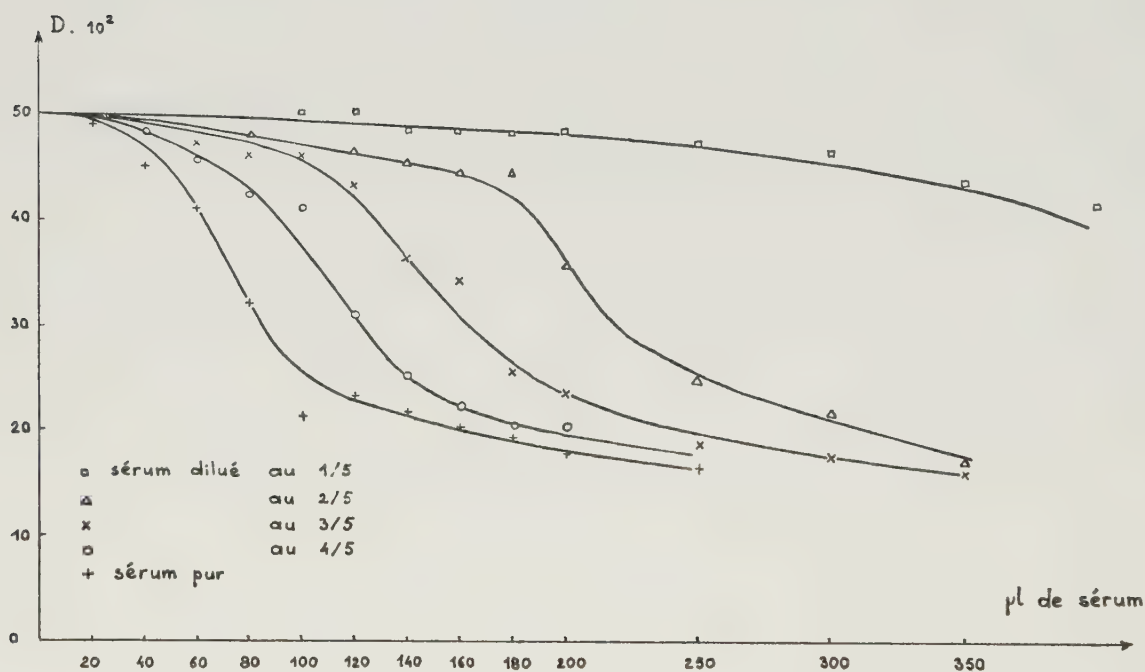


Figure I6 - Variations des tracés en fonction du titre des sérums en obsistine. En abscisses la quantité de sérum ajoutée, exprimée en µl, en ordonnées la densité optique multipliée par 100.

c) Variations des tracés en fonction du temps de contact entre le sérum et les bactéries.

Pour un même échantillon de sérum, nous avons tracé les courbes de la lyse bactérienne après 30 et après 60 minutes de contact entre le sérum et les bactéries. La figure I7 montre que la diminution de la densité optique est plus nette après 60 minutes. D'autre part, le tracé obtenu dans ces conditions se rapproche davantage d'une sigmoïde vraie.

Nous avons donc décidé d'utiliser systématiquement un temps de contact de 60 minutes pour tous nos titrages d'obsistine.

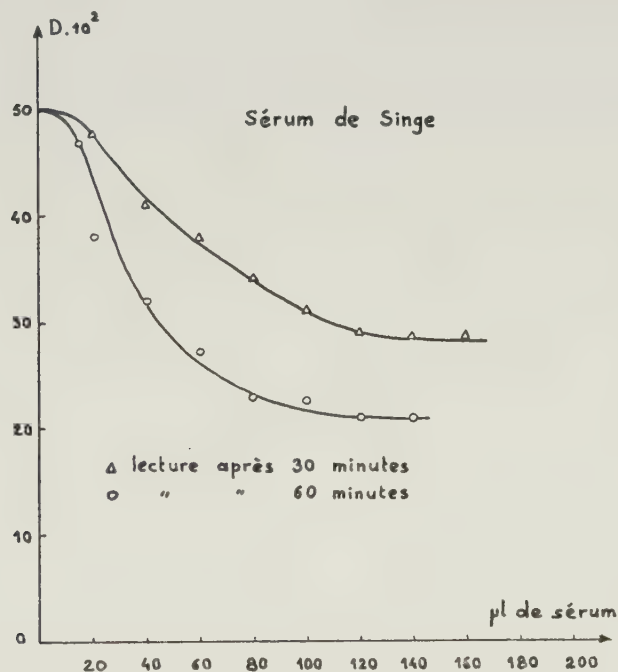


Figure I7 - Variations des tracés en fonction du temps de contact entre le sérum et les bactéries. En abscisses la quantité de sérum ajoutée, exprimée en µl; en ordonnées la densité optique multipliée par 100.

d) Influence de la densité optique du sérum - Intérêt d'une correction.

Pour chacun des tubes de la réaction, la densité optique lue au photomètre dépend à la fois de l'absorption de la suspension bactérienne et de celle du sérum. Or ces deux facteurs varient en sens inverse. La densité optique due aux bactéries diminue en effet au fur et à mesure que la quantité de sérum augmente. Nous avons donc recherché si le tracé de la courbe est modifié lorsqu'on retranche pour chaque tube la densité optique due à la quantité de sérum qui s'y trouve (figure I8).

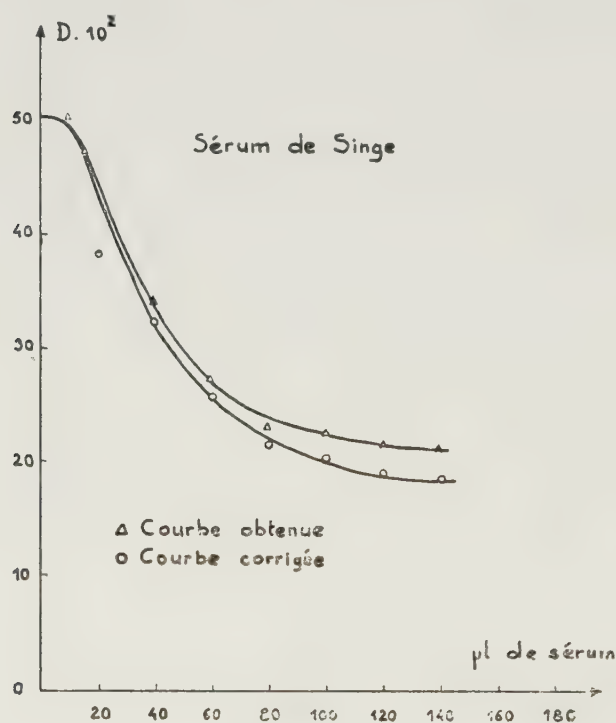


Figure I8 - Influence de la densité optique du sérum.

En abscisses la quantité de sérum ajoutée, exprimée en µl;
en ordonnées la densité optique multipliée par 100.

Effectivement, la figure I8 montre que cette correction modifie sensiblement la courbe, surtout au niveau de l'asymptote inférieure. Toutefois, nous pensons qu'il n'est pas nécessaire d'effectuer systématiquement cette correction, sauf dans le cas de sérums légèrement hémolysés. En effet, la pente de la sigmoïde est très peu modifiée, or, pour l'interprétation graphique sur papier Log-Probit (454), seule cette pente présente un intérêt.

- 5) Interprétation des résultats. Le phénomène précédemment étudié peut être interprété sur papier Log-Probit * (BONET-MAURY, JUDE et SERVANT (454)). Pour cela, il n'est pas nécessaire de tracer dans un premier temps la sigmoïde. Il suffit de porter directement, sur le papier Log-Probit, en abscisses (échelle logarithmique) les doses de sérum exprimées en μ l et en ordonnées (échelle divisée en probits) les densités optiques lues au microspectrocolorimètre et multipliées par 200. On obtient ainsi une droite qui permet de déterminer le coefficient de lyse 50 p.100 de la suspension bactérienne (figure I9). Ce coefficient est en fait le nombre de microlitres de sérum nécessaire pour diminuer de moitié la densité optique de cette suspension. Il est par exemple de 65 pour le sérum de la figure I9 dont la droite correspond à la courbe non corrigée de la figure I8.

Protocole expérimental.

L'expérimentation a été réalisée sur deux lots constitués respectivement de cinq et quatre singes adultes (Cynocephalus babuin) n'ayant jamais reçu de vaccin antityphoïdique. Les échantillons de sang ont été prélevés, chez ces animaux, par ponction des veines de l'avant bras.

Pendant les trois semaines qui ont précédé l'injection de A_{II} , on a contrôlé le taux d'obsistine de chaque animal, en effectuant un dosage par semaine. Chacun d'entre eux a reçu alors par voie intraveineuse 3 mg de A_{II}

* Papier Log-Probabilité (pour courbes de toxicité) d'après P. BONET-MAURY, en dépôt chez JOUAN, 113, boulevard Saint-Germain, Paris.

dispersé dans 3 ml de solution à 3,5 p.100 de Subtosan. Des dosages d'obsistine pratiqués tous les sept jours environ ont permis de suivre l'évolution de la concentration de ce facteur dans chacun des sérums.

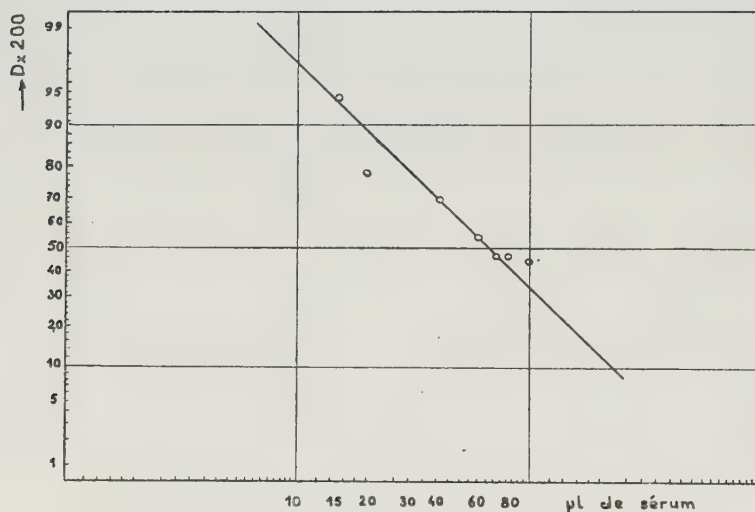


Figure I9 - Interprétation des résultats sur papier Log-Probit.

En abscisses (échelle logarithmique) la quantité de sérum ajoutée, exprimée en μl - En ordonnées (échelle divisée en probits) les densités optiques lues au microspectrocolorimètre et multipliées par 200, afin d'avoir des chiffres variant entre 0 et 100.

R E S U L T A T S

La figure 20 montre l'évolution du taux d'obsistine au cours de l'expérience chez les singes du Ier lot. On constate que cette évolution est loin d'être parallèle pour tous les animaux. En effet, si l'on observe une augmentation très nette pour les singes 26 et 30, celle-ci est beaucoup moins importante pour les singes 27 et 28, tandis que l'on constate une légère baisse pour le singe 29. Une deuxième injection, pratiquée un mois après la première, n'a provoqué qu'une légère augmentation chez le singe 29 alors que le taux n'a pratiquement pas été modifié chez les singes 27, 28 et 30.

Pour le deuxième lot d'animaux (fig. 21), on observe une augmentation fugace de l'obsistine après la première injection de A_{II} chez les singes 35 et 37. On constate au contraire une diminution de ce facteur chez les singes 1 et 36. La deuxième injection de A_{II} a provoqué une nette augmentation du taux de l'obsistine chez trois des animaux, deux d'entre eux ayant cependant accusé au préalable une baisse passagère de ce facteur.

On note que dans ce lot d'animaux le taux d'obsistine a varié considérablement et d'une façon très irrégulière pendant la période séparant les deux injections. Il est donc difficile d'en tirer des enseignements concluants.

Il nous a paru intéressant de rechercher si l'injection de A_{II} en quantité plus importante pouvait modifier d'une façon plus significative le taux d'obsistine. La figure 22 montre les résultats obtenus en injectant à un lot de trois singes 15 mg de A_{II} par voie intraveineuse; cette première injection étant suivie, trois semaine après, de quatre injections de la même dose pratiquées quotidiennement. Aucune variation significative du taux d'obsistine n'a pu être mise en évidence.

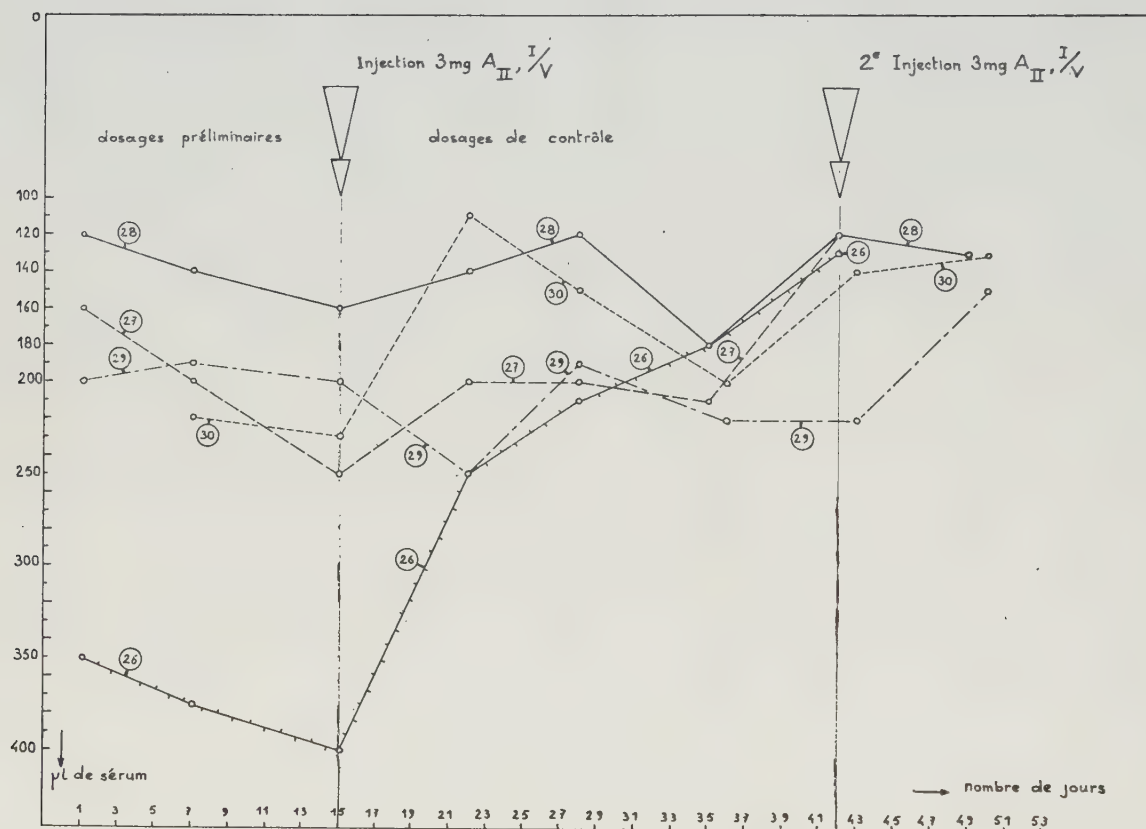


Figure 20 - Evolution du taux d'obsistine chez les singes du Ier lot.

(En abscisses le nombre de jours - En ordonnées le nombre de μ l de sérum nécessaire pour lyser 50 p.100 des bactéries).

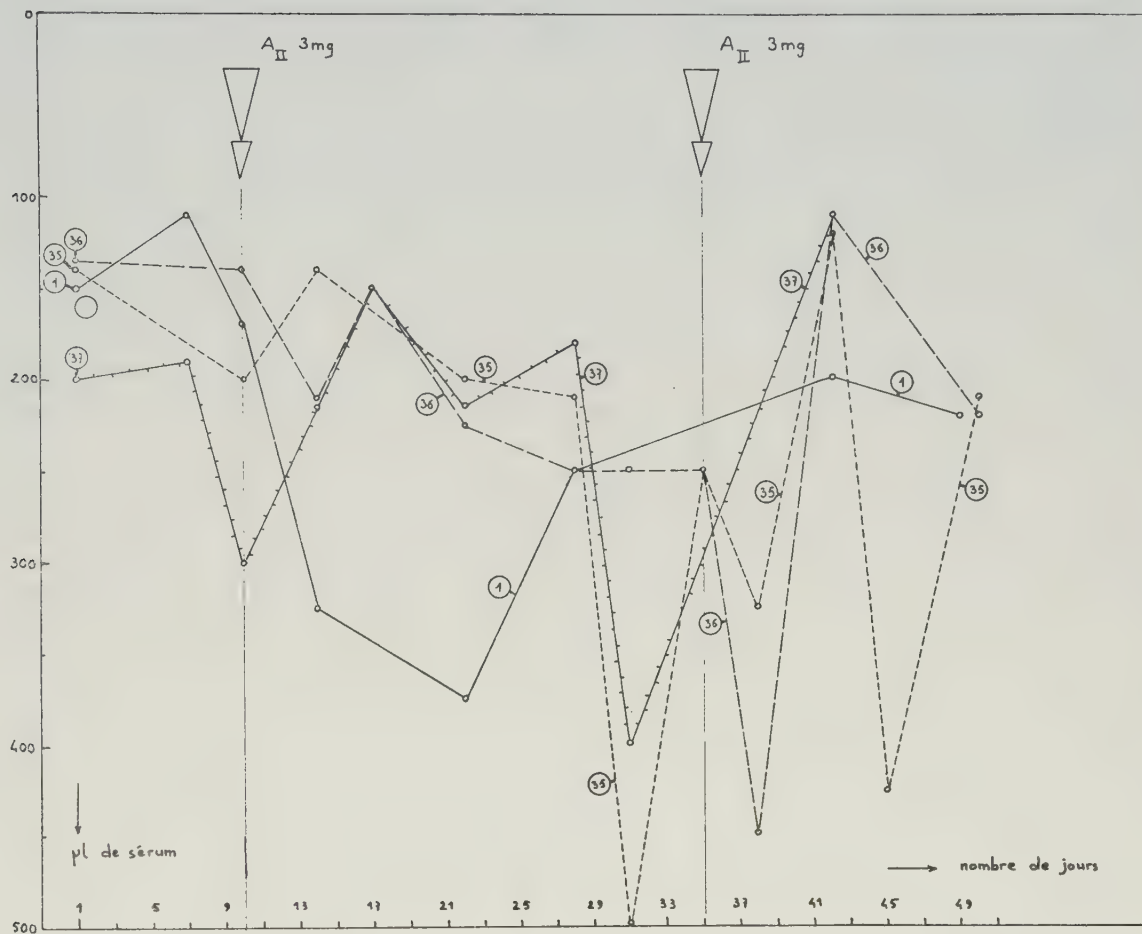


Figure 2I - Evolution du taux d'obsistine chez les singes du 2ème lot.

(En abscisses le nombre de jours - En ordonnées le nombre de μ l de sérum nécessaire pour lyser 50 p.100 des bactéries).

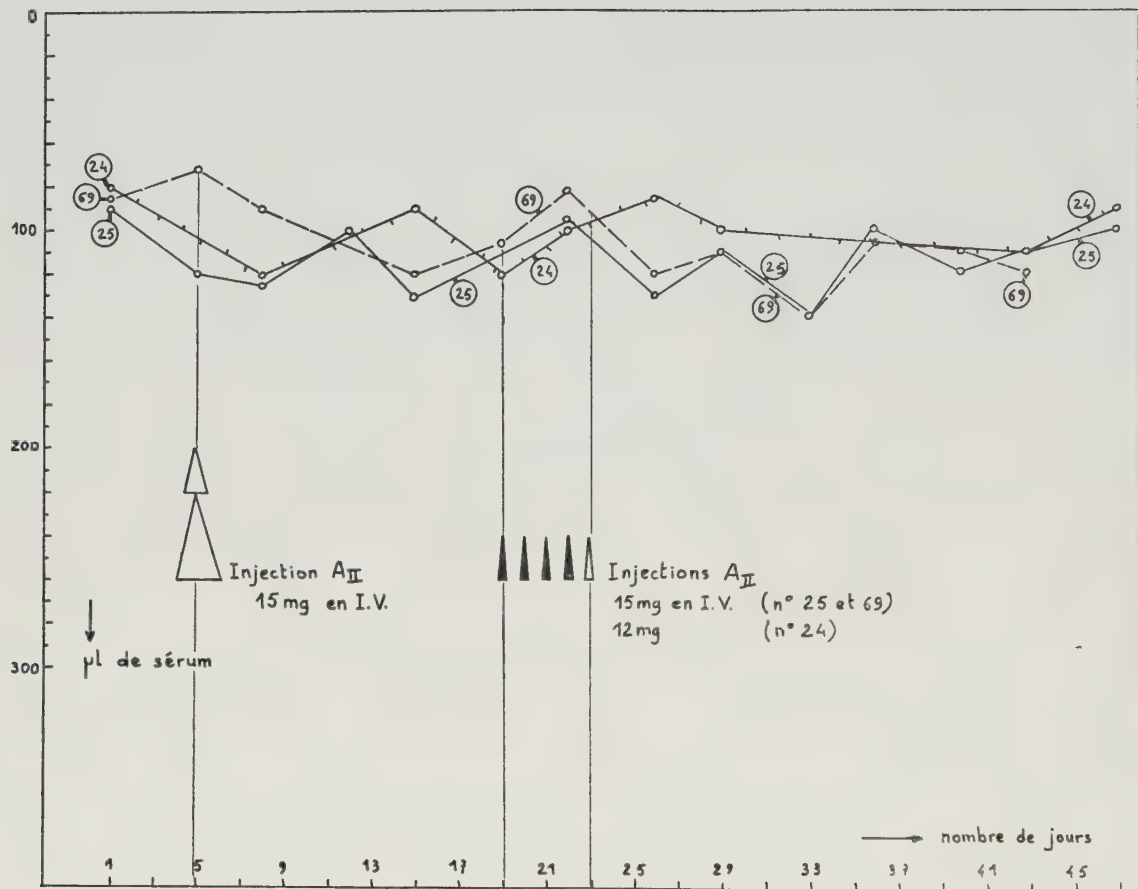


Figure 22 - Evolution du taux d'obsistine chez les singes ayant reçu des doses massives de A_{II}

(En abscisses le nombre de jours - En ordonnées le nombre de µl de sérum nécessaire pour lyser 50 p.100 des bactéries).

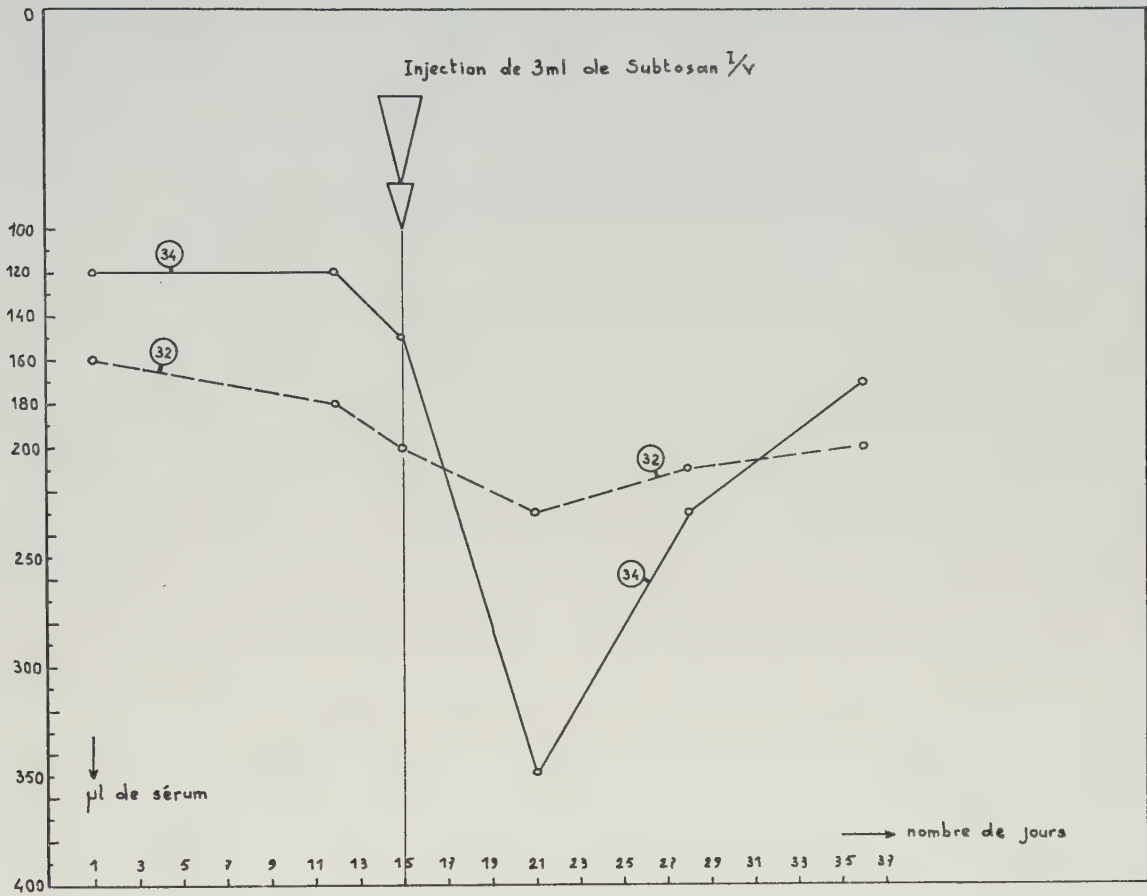


Figure 23 - Evolution du taux d'obsistine chez les singes après injection de Subtosan.

(En abscisses le nombre de jours - En ordonnées le nombre de µl de sérum nécessaire pour lyser 50 p.100 des bactéries).

La figure 23 montre l'influence d'une injection de 3 ml de solution à 3,5 p.100 de Subtosan sur un lot de deux singes. Le taux d'obsistine paraît subir chez ces animaux une baisse passagère assez marquée.

C O N C L U S I O N

Les résultats obtenus ne permettent pas de conclure d'une façon affirmative à une augmentation du taux d'obsistine chez les singes après injection intraveineuse de A_{II}. Toutefois, nous verrons dans la discussion générale l'interprétation que l'on peut donner à ce phénomène.

C H A P I T R E VI

RECHERCHE D'UN POUVOIR SEROPROTECTEUR EVENTUEL SUR LA SOURIS DES SERUMS DE SINGES AYANT RECU DES INJECTIONS DE A_{II}.

Bien que les injections de A_{II} n'eussent pas modifié le taux d'anticorps spécifiques ou l'activité de l'obsistine chez les singes, on pouvait se demander si ces animaux n'avaient pas cependant acquis une certaine immunité vis à vis des infections expérimentales. Comme de telles infections sont difficilement réalisables chez les singes, nous avons simplement recherché si les sérums des animaux qui avaient reçu du lipide A_{II} par voie intraveineuse pouvaient protéger la souris contre l'injection d'une quantité de bacilles virulents suffisante pour provoquer la mortalité 100 p.100 des témoins.

M O D E O P E R A T O I R E

Le titrage du pouvoir protecteur a été effectué suivant les procédés classiques (BONNEFOI et GRABAR (455), FELIX et PITT (456), GRABAR et LE MINOR (457)) / injection intrapéritonéale à des lots de souris de 0,5 ml de dilution en progression géométrique du sérum à étudier, suivie une heure plus tard par l'injection intrapéritonéale de la dose d'épreuve de bactéries, soit 200. 10⁶ germes, sous un volume de 0,5 ml; la DL₅₀ de la souche utilisée (Eberthella typhi Ty 2) étant de 70. 10⁶ (limites de confiance 94. 10⁶ et 52. 10⁶) *

* Les limites de confiance ont été déterminées par la méthode de BONET-MAURY, JUDE et SERVANT (454) à partir de la courbe des variations du pourcentage de mortalité en fonction de la dose, cette courbe étant établie sur papier Log-Probitt

Sérums	Numéro des animaux ayant reçu des injections de A _{II}				Numéro des animaux témoins		
	6	7	8	9	I2	I3	I4
A	I/I7	I/20	I/I5,4	I/I2	I/20	I/I6,5	I/22
B	I/I6	I/II,5	I/I2,5	I/I4,5	I/I4,5	I/I6	I/II,5
C	I/I2,5	I/I4,5	I/I5,5	I/I0	I/I0,6	I/9	I/7
D	I/28,4	I/20	I/28	I/32	I/28	I/20	I/40
E	I/I6,5	I/I2,5	I/I3,5	I/I4,3	I/I8,2	I/I4	I/9

Tableau IO - Variation du taux de dilution des sérums assurant 50 p.100 de protection chez la souris (chaque titrage porte sur 20 animaux).

Doses de A _{II} injectées	= 5000. 10 ⁻⁶ g	pour l'animal n° 7
(suspension aqueuse)	500. 10 ⁻⁶ g	" n° 9
	50. 10 ⁻⁶ g	" n° 6
	5. 10 ⁻⁶ g	" n° 8

Prélèvement des sérums : A = avant l'injection, B = 24 h après l'injection
C = 48 h après l'injection, D = 8 jours après l'injection, E = 15 jours après l'injection.

Les résultats ont été obtenus par la méthode de mesure statistique de l'immunité de BONET-MAURY, JUDE et SERVANT (454). Ils expriment la dilution de sérum protégeant 50 p.100 des souris contre la dose d'épreuve.

R E S U L T A T S

L'ensemble des résultats est groupé dans le tableau IO. Ces chiffres ne présentent aucune différence significative; les petites variations observées se trouvent en effet comprises dans les limites de confiance.

C O N C L U S I O N

La fraction lipidique A_{II}, dispersée dans une solution à 3,5 p.100 de Subtosan et injectée à des singes à doses variables, ne fait apparaître dans le sérum de ces derniers aucun facteur capable de protéger la souris vis à vis d'une dose d'épreuve mortelle d'Eberthella typhi Ty 2.

C H A P I T R E VII

INFLUENCE DE L'INJECTION DE LIPIDE A_{II} SUR LE NIVEAU DE L'IMMUNITE NON

SPECIFIQUE CHEZ LA SOURIS *

Puisque les sérums des singes qui ont reçu des injections de lipide A_{II} ne peuvent pas protéger la souris contre une infection expérimentale, il était intéressant de rechercher si la fraction A_{II}, injectée directement à la souris modifie le niveau de l'immunité non spécifique chez cette dernière.

MODE OPERATOIRE

Des souris blanches, d'un poids moyen de 22 g, ont reçu par voie intrapéritonéale différentes doses de A_{II}. Quatre jours après, on leur a injecté, par la même voie, $25 \cdot 10^6$ bactéries (Eberthella typhi Ty 2**, souche I.M.574) sous un volume de 0,5 ml. La lecture des résultats a été effectuée après trois jours pour les animaux témoins et après dix jours pour les animaux traités.

* Cette expérimentation a été réalisée à l'Institut Mérieux, Marcy-l'Etoile (Rh.)

** Chez cette souche l'antigène O est masqué par l'antigène Vi.

R E S U L T A T S

1) Témoins d'activité. Chaque animal a reçu une injection d'un produit connu pour son activité. Il s'agit de la préparation SR₂ lot 2I F.D., à la dose de 2 mg dans un volume de 0,5 ml d'eau physiologique tamponnée.

Les résultats ont été les suivants :

Animaux traités	=	13 survivants/19
Animaux non traités	=	0 survivants/20

2) Essai avec A_{II} en suspension huileuse. Divers lots de souris ont reçu des doses différentes de A_{II} en suspension huileuse. Les résultats obtenus en fonction de la dose injectée ont été les suivants :

10. 10 ⁻⁶ g	=	4 survivants/18
25. 10 ⁻⁶ g	=	3 survivants/19
50. 10 ⁻⁶ g	=	9 survivants/19
Témoins sans A _{II}	=	1 survivant /10

3) Essai avec A_{II} en suspension aqueuse. Les résultats obtenus en fonction de la dose injectée ont été les suivants :

10. 10 ⁻⁶ g	=	4 survivants/20
25. 10 ⁻⁶ g	=	7 survivants/20
50. 10 ⁻⁶ g	=	12 survivants/19

C O N C L U S I O N

Injectée à des souris par voie intrapéritonéale à la dose de 50.10⁻⁶g, la fraction lipidique A_{II} augmente considérablement le niveau de l'immunité non spécifique.

C H A P I T R E VIII

PROPRIETES ADJUVANTES DE A_{II}

STONE (356) a défini l'adjuvant comme étant "une substance qui exalte l'expression immunologique, soit par l'augmentation de la production d'anticorps, soit par l'exagération de l'hypersensibilité du type retardé". Nous avons vu que le pouvoir adjuvant des bactéries à Gram négatif a pu être rapporté au lipide lié de l'antigène somatique. FARTHING (353, 354), en particulier, a démontré que les lipides A bruts extraits d'Escherichia coli et de Bordetella pertussis, stimulent la production d'antitoxines chez l'animal, lorsqu'on les injecte en association avec l'anatoxine diphtérique, leur pouvoir adjuvant étant cependant plus faible que celui des lipopolysaccharides correspondants.

Il était donc intéressant de rechercher si, dans le cas d'Eberthella typhi, une fraction de lipide purifiée telle que A_{II} conservait encore des propriétés adjuvantes. Pour cela, nous avons étudié comparativement le pouvoir adjuvant de l'adjuvant complet de FREUND, d'Eberthella typhi, de son endotoxine et de la fraction lipidique A_{II} extraite de cette endotoxine.

MATERIEL ET METHODES

Animaux.

Nous avons utilisé des lapins de race commune provenant de différents élevages, les croisements étant réalisés dans l'animalerie du laboratoire.

Produits injectés.

Adjuvant complet de Freund - Il a été préparé de la façon suivante. Pour obtenir 10 ml d'adjuvant, on a mélangé 50 mg de BCG lyophilisé (ampoules de l'Institut Pasteur), mis en suspension dans 1 ml de solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M à 8,5 ml d'huile de paraffine et à 1,5 ml de Tween 80.

Dans certains cas, il a paru avantageux de le préparer d'une autre manière. Pour cela, 50 mg de BCG ont été dispersés dans 1 ml de solution de chlorure de sodium 0,15 M. On y a ajouté 8,5 ml d'huile de paraffine et 1,5 ml de lanoline.

Eberthella typhi - Nous avons utilisé la souche 0-901 d'Eberthella typhi cultivée pendant 48 heures en milieu liquide, dans les conditions décrites au chapitre I, puis recueillies par centrifugation. Elles ont ensuite été lavées à l'eau distillée, remises en suspension dans de l'eau distillée et lyophilisées; elles sont donc pour une grande part encore vivantes.

Pour préparer l'adjuvant, on a émulsionné 25 mg d'Eberthella typhi, en suspension dans 1 ml de solution de chlorure de sodium 0,15 M, avec 8,5 ml d'huile de paraffine et 1,5 ml de Tween 80 (ou de lanoline).

Endotoxine - L'endotoxine utilisée est constituée par le lipopolysaccharide extrait des bactéries par le procédé phénol-eau, à froid, suivant la technique décrite au chapitre I.

Lipide A_{II} - Nous avons employé un échantillon de lipide A_{II} préparé par le procédé décrit au chapitre I.

Antigène - L'antigène utilisé est la sérum-albumine humaine (SAH) cristallisée.

Dosage des anticorps.

Préparation des sérums à doser - Chaque animal a subi une ponction cardiaque toutes les semaines pendant huit semaines. Dans certains cas, les prises de sang ont été effectuées dans une veine de la patte.

Le sang a été aussitôt additionné d'anticoagulant *, puis dilué au dixième dans une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M et centrifugé. Le sérum surnageant a été alors décomplémenté par chauffage à 56°C dans un bain-marie pendant une demi-heure.

Pour éliminer les anticorps de Forsman, on a procédé à deux extractions successives, en ajoutant deux gouttes de culot de globules rouges de mouton à 1 ml de sérum dilué au dixième. Le mélange a été maintenu à la température du laboratoire pendant une heure puis centrifugé. Le sérum dilué ainsi obtenu a été alors placé dans un congélateur jusqu'au jour où l'on a pratiqué le dosage des anticorps anti-SAH.

Méthode de dosage des anticorps - Le titrage des anticorps anti-SAH a été effectué par la technique d'hémagglutination passive pratiquée à l'aide d'hématies tannées, selon la méthode de BOYDEN (458) modifiée par STAVITSKY (459). Nous avons opéré de la façon suivante.

A 0,2 ml de culot de globules rouges de mouton préalablement lavés dans une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M, on ajoute 7,8 ml de

* Il s'agit d'un mélange de 2 g d'oxalate de sodium et de 1 g de fluorure de sodium pour 600 ml de sang.

tampon phosphate 0,15 M de pH 7,2 *. Cette suspension est additionnée de 8 ml de solution de tanin ** et placée dans un bain-marie à 37°C pendant 10 minutes. On centrifuge alors doucement, puis on lave le culot avec 8 ml de solution tampon isotonique de pH 7,2 ***. Les hématies sont finalement remises en suspension dans 8 ml de solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M. Elles peuvent être conservées à 5°C pendant dix-huit heures.

On mélange alors dans l'ordre : 28 ml de solution tampon isotonique de pH 6,4 ****, 7 ml de solution de SAH à 5 mg/ml dans du soluté chloruré isotonique et 7 ml de la suspension d'hématies tannées.

Les hématies tannées témoins sont préparées en remplaçant la solution d'antigène par du sérum de lapin normal dilué au dixième, c'est-à-dire qu'à 1 ml de tampon de pH 6,4, on ajoute 1 ml de sérum de lapin normal dilué au dixième dans du soluté chloruré isotonique et 1 ml d'hématies tannées.

Ces suspensions sont maintenues pendant dix minutes à la température du laboratoire, puis centrifugées. On lave le culot d'hématies sensibilisé

* Pour préparer 100 ml de ce tampon on mélange 23,9 ml de solution aqueuse de phosphate monopotassique 0,15 M avec 76 ml de solution aqueuse de phosphate disodique 0,15 M.

** Tanin à l'éther dissous dans une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M à la concentration de 1 g pour 20.000 ml.

*** La solution tampon isotonique de pH 7,2 est préparée en mélangeant à parties égales la solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M et le tampon phosphate 0,15 M de pH 7,17.

**** La solution tampon isotonique de pH 6,4 est préparée en mélangeant à parties égales la solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M et le tampon phosphate 0,15 M de pH 6,4.

Pour préparer 100 ml de ce tampon on mélange 32,2 ml de solution aqueuse de phosphate disodique 0,15 M avec 67,7 ml de solution aqueuse de phosphate monopotassique 0,15 M.

avec 14 ml de sérum de lapin normal dilué au centième, tandis que les hématies tannées témoins sont lavées avec 2 ml du même sérum. On les remet alors en suspension respectivement dans 7 ml et 1 ml de sérum de lapin normal dilué au centième.

Pour préparer le sérum de lapin normal dilué au centième, on fait une ponction cardiaque à un lapin normal. Ce sang est additionné d'anticoagulant et centrifugé. Le sérum est placé pendant une demi-heure à 56°C pour être décomplémenté, puis on élimine les anticorps de Forsman en procédant de la même façon que pour les sérums à doser, mais en ajoutant dans ce cas un volume égal d'hématies de moutons lavées. Le sérum ainsi traité est ensuite dilué au centième dans du sérum physiologique.

Pour le titrage proprement dit, on dilue l'anti-sérum à l'aide du sérum de lapin normal dilué au centième dans une série de tubes à hémolyse de façon que chacun de ceux-ci contienne 0,5 ml de sérum dilué. Les dilutions utilisées sont $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{40}$, $\frac{1}{80}$, $\frac{1}{160}$ etc...

Pour chaque série de titrages on réalise des témoins avec des sérums positifs, avec le sérum normal et avec les hématies tannées non sensibilisées.

A l'aide d'une pipette de 1 ml, on ajoute dans chaque tube une goutte d'hématies préparées. On agite et on laisse à la température du laboratoire. Les réactions sont lues au bout de douze heures environ. Dans le cas d'une réaction négative, les hématies se collectent en un amas de 2 à 3 mm de diamètre situé à la partie la plus déclive du fond du tube. Quand la réaction est positive, les hématies se déposent sur toute la surface du fond du tube, soit sur un diamètre d'environ 8 mm.

Le titre en anticorps est exprimé par l'inverse de la dilution extrême pour laquelle on observe une réaction positive.

Injections - Les préparations ont été injectées sous le volume de 0,4 ml (sauf deux de 0,2 ml) dans le péritoine des animaux.

Lots témoins.

- Lot n° 1 - 2 lapins : 0,17 ml d'huile de paraffine
0,03 ml de Tween
0,2 ml de solution de Na Cl 0,15 M.
- Lot n° 2 - 8 lapins : Dans le mélange précédent, on a remplacé le Tween par de la lanoline.
- Lot n° 3 - 3 lapins : 1 mg de BCG dans 0,02 ml de solution de Na Cl 0,15M.
0,17 ml d'huile de paraffine
0,03 ml de lanoline
0,18 ml de solution de Na Cl 0,15 M.
- Lot n° 4 - 4 lapins : 0,5 mg d'Eberthella typhi dans
0,02 ml de solution de Na Cl 0,15 M
0,17 ml d'huile de paraffine
0,03 ml de Tween
0,18 ml de solution de Na Cl 0,15 M.
- Lot n° 5 - 3 lapins : 500×10^{-6} g de lipide A₂
0,17 ml d'huile de paraffine
0,03 ml de lanoline.
- Lot n° 6 - 2 lapins : identique au lot n° 5
- Lot n° 7 - 3 lapins : 1 mg de SAH dans 0,2 ml de solution de Na Cl 0,15M.

Lot n° 8 - 2 lapins : 0,17 ml d'huile de paraffine
0,03 ml de Tween
1 mg de SAH dans 0,2 ml de solution de NaCl 0,15M.

Lot n° 9 - 6 lapins : Dans le mélange précédent on a remplacé le Tween
par de la lanoline.

Lots ayant reçu divers adjuvants mélangés à l'antigène.

Adjuvant complet de Freund

Lot n° 10 - 3 lapins : 1 mg de BCG dans 0,02 ml de solution de NaCl 0,15M
0,17 ml d'huile de paraffine
0,03 ml de Tween
1 mg de SAH dans 0,18 ml de solution de NaCl 0,15M.

Lot n° 11 - 7 lapins : identique au lot n° 10.

Lot n° 12 - 3 lapins : Dans le mélange précédent on a remplacé le Tween
par de la lanoline.

Eberthella typhi

Lot n° 13 - 4 lapins : 0,5 mg d'Eberthella typhi dans 0,02 ml de solution
de NaCl 0,15 M
0,17 ml d'huile de paraffine
0,03 ml de Tween
1 mg de SAH dans 0,18 ml de solution de NaCl 0,15M.

Lot n° 14 - 3 lapins : identique au lot n° 13.

Endotoxine

- Lot n° 15 - 2 lapins : 0,1 x 10⁻⁶ g d'endotoxine
0,17 ml d'huile de paraffine
0,03 ml de lanoline
1 mg de SAH dans 0,18 ml de solution de NaCl 0,15M.
- Lot n° 16 - 2 lapins : dans le mélange précédent on a remplacé 0,1 x 10⁻⁶ g d'endotoxine par 1 x 10⁻⁶ g.
- Lot n° 17 - 2 lapins : mélange identique à celui du lot n° 15 mais contenant 10 x 10⁻⁶ g d'endotoxine.
- Lot n° 18 - 2 lapins : mélange identique à celui du lot n° 15 mais contenant 100 x 10⁻⁶ g d'endotoxine.

Lipide A₂

- Lot n° 19 - 8 lapins : 500 x 10⁻⁶ g de lipide A₂
0,17 ml d'huile de paraffine
0,03 ml de lanoline
1 mg de SAH dans 0,18 ml de solution de NaCl 0,15M.

R E S U L T A T S

Lots n'ayant pas reçu de bactéries ou d'extraits bactériens comme adjuvants

Les sérums des lapins appartenant aux lots 1, 2, 3, 4, 5, 6, qui n'avaient pas reçu de SAH ne contenaient pas d'anticorps décelables pendant la durée de l'observation (huit semaines).

Les sérums des lapins du lot n° 7, qui avaient reçu de la SAH sans huile, ont été également négatifs, pendant toute la durée de l'observation (deux mois).

Les deux lapins du lot n° 8 avaient reçu de la SAH mélangée à l'huile et au Tween. L'un a donné des résultats négatifs, l'autre a présenté un sérum positif au $\frac{1}{20}$ à la huitième semaine.

Le lot n° 9, composé de six animaux, ne différait du précédent que parce qu'on avait remplacé le Tween par de la lanoline. La moyenne arithmétique des résultats des dosages nous a donné les titres suivants : absence d'anticorps jusqu'à la septième semaine, hémagglutination au $\frac{1}{12}$ à partir de la septième semaine, hémagglutination au $\frac{1}{20}$ à partir de la huitième semaine.

Lots ayant reçu des extraits bactériens ou des bactéries mélangés à l'antigène

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau II. Ces valeurs correspondent à la moyenne arithmétique des titres hémagglutinants pour chaque série de prises de sang.

Nous n'avons pas fait figurer dans ce tableau les résultats obtenus à l'aide de l'endotoxine. En effet, quelle que fut la dose d'endotoxine injectée, entre $0,1 \times 10^{-6}g$ et $100 \times 10^{-6}g$, les lots I5, I6, I7 et I8 ne présentaient pas d'anticorps décelables à la deuxième semaine ni à la quatrième. A la cinquième semaine, seul un lapin sur deux ayant reçu $100 \times 10^{-6}g$ d'endotoxine avait un sérum positif au $\frac{1}{60}$, tous les autres sérums dosés étant négatifs. A la septième semaine un lapin ayant reçu $1 \times 10^{-6}g$ d'endotoxine avait un sérum positif au $\frac{1}{20}$, un des deux lapins en ayant reçu $10 \times 10^{-6}g$ avait également un sérum positif au $\frac{1}{20}$, alors que l'autre avait un sérum négatif. A la onzième semaine, un des deux lapins du lot n° I6 avait un

Durée de l'observation	Témoins SAH sans adjuvant	SAH + adj. de Freund avec Tween	SAH + adj. de Freund avec lanoline	SAH + <u>E. typhi</u>	SAH + <u>A_{II}</u>
I ère semaine	0	0	-	-	-
2 ème -	0	0	0	I/110	I/63
3 ème -	0	0	I/190	I/90	I/720
4 ème -	0	0	-	I/390	-
5 ème -	0	I/16	I/330	I/480	I/950
6 ème -	0	I/70	I/470	I/490	I/3.840
7 ème -	0	I/170	I/4.290	I/590	-
8 ème -	0	I/320	-	I/270	-

Tableau II - Etude comparative du pouvoir adjuvant de l'adjuvant de FREUND, d'Eberthella typhi, de son endotoxine et du lipide A_{II}

(Les résultats correspondent au titre hémagglutinant moyen pour chaque lot de lapins).

sérum positif au $\frac{I}{80}$, tandis que l'un des deux lapins du lot n° I7 avait un sérum positif au $\frac{I}{40}$. Il n'y a pas eu d'autres dosages.

Ces résultats sont probablement la conséquence de la nécessité de n'injecter que des doses très faibles d'endotoxine, du fait de sa toxicité. Les animaux ayant reçu la dose la plus forte, 100×10^{-6} g sont en effet tous morts en cours d'observation.

C O N C L U S I O N S

La fraction lipidique de A_{II} , injectée par voie intrapéritonéale à la dose de 500×10^{-6} g, constitue un adjuvant supérieur à tous les autres produits essayés, qu'il s'agisse de l'adjuvant complet de FREUND, d'Eberthel la typhi ou de l'endotoxine extraite de cette bactérie. Il convient cependant de noter que l'endotoxine n'a pu être utilisée qu'à faible dose, du fait de sa toxicité.

C H A P I T R E IX

RECHERCHE DES PROPRIETES ANTITUMORALES EVENTUELLES DE LA FRACTION A_{II}

Nous avons rappelé que certaines préparations de lipide A purifié peuvent provoquer une nécrose hémorragique au niveau des tumeurs du sarcome I80 de la souris, ce résultat étant obtenu avec une injection unique de $1 \cdot 10^{-5}$ g de lipide, par voie intrapéritonéale ou intraveineuse. KASAI et coll. (209) ont même constaté 40 à 60 p.100 de guérisons, chez des souris porteuses de l'ascite d'Ehrlich, après des injections intrapéritonéales de $1 \cdot 10^{-4}$ g de lipide A, répétées quotidiennement pendant 7 jours consécutifs. Il était donc intéressant de rechercher si la fraction lipidique A_{II} possédait également des propriétés antitumorales. C'est pourquoi nous avons étudié son activité successivement sur le sarcome I de la souris, puis sur le sarcome de Rous dont l'animal hôte est le poulet.

I - RECHERCHE D'UNE ACTION EVENTUELLE DE A_{II} SUR LE SARCOME I DE LA SOURIS.

MATERIEL ET METHODES

Animaux.

Les expériences ont été réalisées sur des souris blanches BALB/c * adultes, pesant entre 20 et 22 grammes.

* Ces animaux provenaient du Centre de Sélection des Animaux de laboratoire 5, rue Gustave Vatonne - Gif-sur-Yvette (S. et O.).

Souche tumorale

Nous avons utilisé le sarcome I * de la souris, dont l'historique a déjà été publié par ROSOE (460).

Suspensions injectables de A_{II}

Les suspensions injectables ont été préparées à l'aide du dispositif précédemment décrit. La suspension aqueuse a été obtenue en dispersant dans une solution aqueuse de Subtosan à 3,5 p.100, une quantité de lipide A_{II} telle que la concentration finale soit égale à $200 \cdot 10^{-6}$ g/ml.

Pour préparer la suspension huileuse, nous avons remplacé la solution de Subtosan par de l'huile d'olive neutralisée et stérilisée. Cette suspension contenait également $200 \cdot 10^{-6}$ g de A_{II} par ml.

Inoculations

Inoculé par voie sous cutanée, le sarcome I présente une tumeur palpable à partir du septième jour. Au bout de trois semaines, les dimensions moyennes de cette dernière sont de 20 x 10 x 5 mm. Au début de nos expériences nous prélevions stérilement, sur une tumeur de trois semaines, des fragments cubiques de 2 mm de côté environ que nous introduisions ensuite sous la peau des souris à greffer, à l'aide d'un trocart de Rudali stérile. Mais nous avons pu constater, après une étude systématique, que cette technique donnait moins de 80 p.100 de réussite, et pouvait donc conduire à des erreurs grossières pour l'étude des propriétés antitumorales de A_{II} .

Nous avons finalement décidé d'opérer par injection de liquide d'ascite tumorale, prélevé stérilement au dixième jour après l'inoculation intrapérito-

* Nous avons obtenu cette souche de l'Institut Gustave Roussy, Villejuif (SetO) grâce à l'obligeance du Professeur GUERIN.

néale du sarcome. Ce liquide contient en moyenne $80 \cdot 10^6$ cellules par ml. On peut le diluer à l'aide du "milieu synthétique I99 modifié" de l'Institut Pasteur. Nous avons observé qu'en injectant à chaque souris 200 000 cellules ascitiques, on obtenait, suivant la voie d'introduction, une ascite ou une tumeur solide dans tous les cas.

Il arrive fréquemment que les injections intrapéritonéales donnent naissance simultanément à une ascite et à une tumeur solide. Celle-ci est due probablement à une greffe accidentelle, provoquée par le passage de l'aiguille à travers la peau et le péritoine.

Technique expérimentale

Les souris ont été réparties en 14 lots de 3 souris chacun. Un lot témoin de 3 animaux n'a pas reçu de cellules tumorales et servait uniquement à vérifier l'absence de toxicité de A_{II} aux doses injectées (témoins A_{II}). Au jour J, toutes les souris des autres lots ont reçu chacune par voie intrapéritonéale, 200.000 cellules d'ascite, sous un volume de 0,25 ml. Parallèlement, chaque animal a reçu $100 \cdot 10^{-6}$ g de A_{II} quotidiennement pendant 10 jours consécutifs. Ces injections de A_{II} ont débuté respectivement à J-3 pour le premier lot, J-1 pour le deuxième lot, J-0 pour le troisième lot, J+1 pour le quatrième lot, J+3 pour le cinquième lot, J+5 pour le sixième lot, et ainsi de suite jusqu'à J+17. Un lot de 3 animaux n'a pas reçu de A_{II} et servait de témoin ascite.

Première expérience. Au cours de la première expérience, les animaux ont reçu des injections intramusculaires de $100 \cdot 10^{-6}$ g de A_{II} en suspension dans 0,50 ml d'huile d'olive.

Deuxième expérience. Dans la deuxième expérience, ces injections ont été effectuées par voie intrapéritonéale.

Troisième expérience. Dans la troisième expérience, A_{II} a été administré également par voie intrapéritonéale, mais en suspension dans 0,50 ml de solution à 3,5 p.100 de Subtosan.

Coloration des cellules tumorales.

Les coupes de tumeurs ont été colorées par l'Hémalum-éosine et par la coloration trichromique de Masson. Pour les cellules ascitiques, nous avons utilisé la coloration de May-Grünwald-Giemsa.

R E S U L T A T S

a) Effets des injections de A_{II} sur le décès des souris sarcomateuses.

Les résultats de la première expérience sont donnés par le tableau I2 et la figure 24, ceux de la deuxième expérience par le tableau I3 et la figure 25, ceux de la troisième expérience par le tableau I4 et la figure 26.

On voit que, d'une façon générale, les souris sarcomateuses n'ayant pas reçu de A_{II} (témoins ascite) meurent vers le 25^{ème} jour qui suit l'inoculation du sarcome.

Au cours de la première expérience (A_{II} injecté en suspension huileuse par voie intramusculaire), les décès se sont produits d'une façon très dispersée dans le temps. Toutefois, il semble que la mort soit survenue plus rapidement chez les animaux traités par A_{II} dans les jours qui ont précédé ou suivi immédiatement l'inoculation des cellules tumorales.

[illegible]

Tableau I2 - Première expérience - Etude de l'influence des injections intramusculaires de AII en suspension huileuse sur l'évolution du sarcome I de la souris.

I = injection de 100 mg de AII
 O = inoculation du sarcome
 + = mort d'un animal.

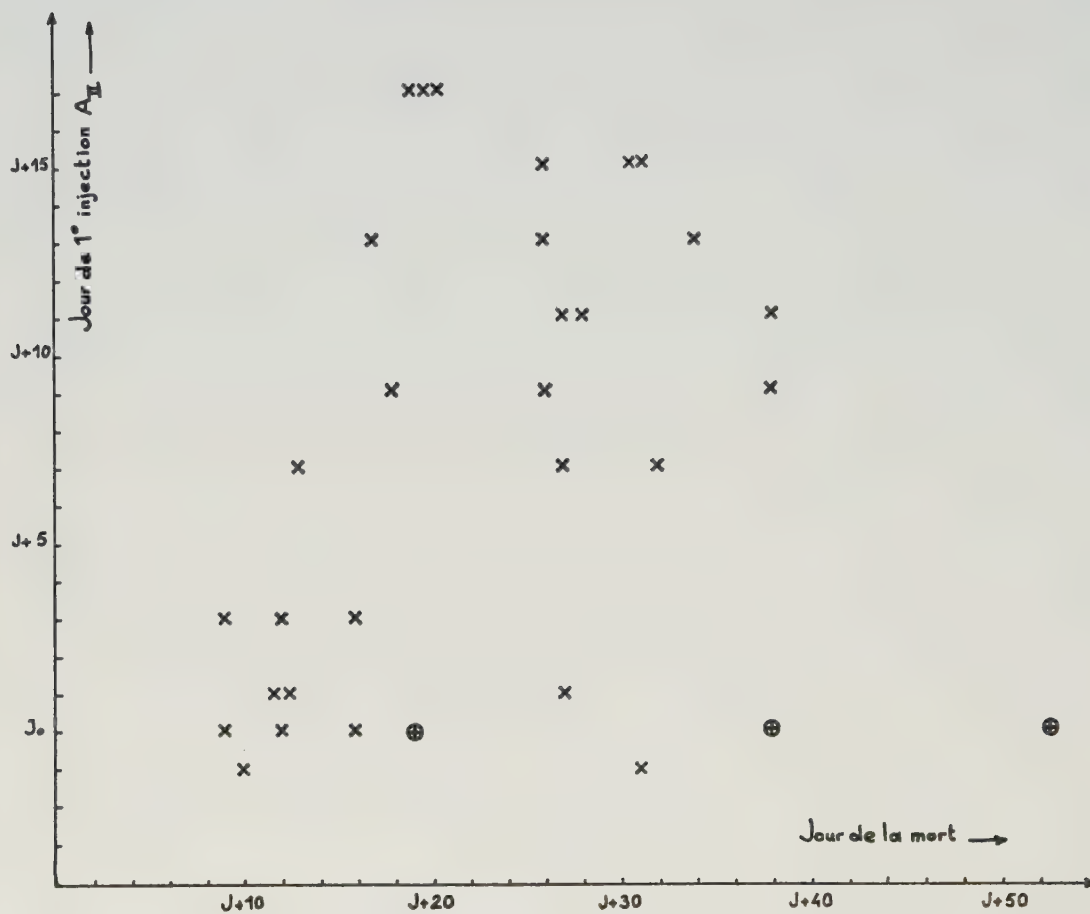


Figure 24 - Première expérience (suite) - Variations de la date du décès des souris sarcomateuses en fonction du décalage entre le début du traitement par A_{II} et l'inoculation du sarcome.

+ = souris traitées par A_{II}

⊕ = souris non traitées.

				□										
J+32														
J+31														
J+30													+	
J+29														
J+28													+	
J+27														
J+26									+					
J+25													+	
J+24														
J+23									+				+	
J+22				+										
J+21														
J+20									\\	\\	+	+		
J+19									\\	\\	+	\\	\\	
J+18									\\	\\	\\	\\	+	+
J+17									\\	\\	\\	\\	\\	\\
J+16				+					+		+			
J+15									+	\\	\\	\\	\\	
J+14								\\	\\	\\	\\	+	+	\\
J+13				+				\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\
J+12				+	+			\\	\\	\\	\\	+	\\	\\
J+11		+	+	+	+			\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\
J+10	+	+						\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\
J+9								\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\
J+8								\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\
J+7								\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\
J+6	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\
J+5	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\
J+4	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\
J+3	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\
J+2	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\
J+1	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\	\\
J ₀	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
J-1	\\	\\	\\	\\										
J-2	\\	\\	\\											
J-3	\\	\\	\\											
	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	N° 8	N° 9	N° 10	N° 11	N° 12	N° 13	N° 14

Tableau I3 - Deuxième expérience - Etude de l'influence des injections intrapéritonéales de A_{II} en suspension huileuse sur l'évolution du sarcome I de la souris.

- = injection de 100 µg de A_{II}
 ○ = inoculation du sarcome
 + = mort d'un animal
 □ = apparition tardive d'une ascite.

			□ Δ	Δ	Δ		Δ	Δ				Δ		
J+32														
J+31														
J+30														
J+29		+												
J+28		+		+										
J+27														
J+26												+	+	
J+25	+										+			
J+24							+							
J+23													+	
J+22						+			+	+	+	+	+	+
J+21									+	+	+	+	+	+
J+20		+	+			+			+	+	+	+	+	+
J+19							+	+	+	+	+	+	+	+
J+18									+	+	+	+	+	+
J+17									+	+	+	+	+	+
J+16				+		+			+	+	+	+	+	+
J+15									+	+	+	+	+	+
J+14				+					+	+	+	+	+	+
J+13	+								+	+	+	+	+	+
J+12									+	+	+	+	+	+
J+11									+	+	+	+	+	+
J+10									+	+	+	+	+	+
J+9									+	+	+	+	+	+
J+8									+	+	+	+	+	+
J+7									+	+	+	+	+	+
J+6									+	+	+	+	+	+
J+5									+	+	+	+	+	+
J+4									+	+	+	+	+	+
J+3									+	+	+	+	+	+
J+2									+	+	+	+	+	+
J+1									+	+	+	+	+	+
J ₀	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
J-1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
J-2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
J-3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5	N°6	N°7	N°8	N°9	N°10	N°11	N°12	N°13	N°14

Tableau I4 - Troisième expérience - Etude de l'influence des injections intra-péritonéales de A_{II} en suspension aqueuse sur l'évolution du sarcome I de la souris.

○ = injection de 100 µg de A_{II}

○ = inoculation du sarcome

+

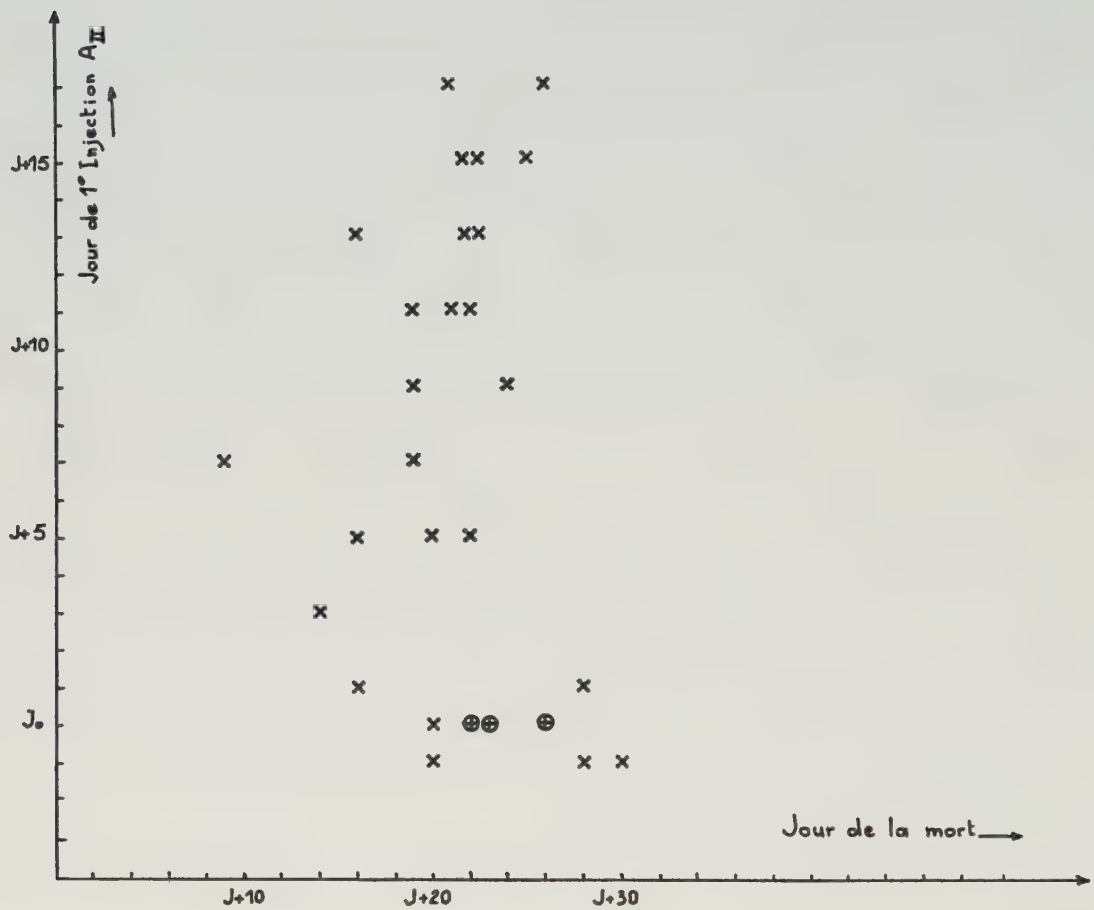


Figure 26 - Troisième expérience (suite) - Variations de la date du décès des souris sarcomateuses en fonction du décalage entre le début du traitement par A_{II} et l'inoculation du sarcome.

+ = souris traitées par A_{II}
 ⊕ = souris non traitées.

Pour la deuxième expérience (A_{II} injecté en suspension huileuse par voie intrapéritonéale), les décès sont plus groupés. Les injections de A_{II} n'ont fait que hâter la mort des animaux. Celle-ci semble survenir plus rapidement chez les animaux traités précocement.

Les animaux ayant servi à la troisième expérience (A_{II} injecté en suspension aqueuse par voie intrapéritonéale), sont morts après un délai sensiblement égal à celui des souris témoins n'ayant pas reçu de lipide.

On peut donc conclure que, d'une façon générale, les injections de lipide A_{II} n'ont pas retardé le décès des souris sarcomateuses.

b) Etude anatomo pathologique des tumeurs *

Témoins sarcome. Du point de vue microscopique, les tumeurs obtenues sont de taille très variable et du type bourgeonnant. Elles présentent quelquefois des cavités à la coupe. Celles-ci sont remplies d'un liquide sérosant aseptique, contenant en suspension des cellules tumorales.

A l'examen microscopique, les tumeurs ne présentent pas de capsule limitante. Elles ont un aspect très dense et se révèlent formées de cellules dont le noyau est très riche en chromatine; le rapport nucléo plasmatique est très grand. Les cellules sarcomateuses s'infiltrèrent dans les faisceaux musculaires en les dissociant. Dans quelques cas on note la présence de microzones hémorragiques, mais les "lacs hémorragiques" se révèlent très rares. Lorsque la tumeur est volumineuse, on rencontre fréquemment dans son centre des régions où les cellules présentent un noyau pycnotique et un contour flou. Les débuts de nécrose sont dûs probablement à une asphyxie des cellules.

* Nous remercions le Médecin-Commandant FONTANGES d'avoir bien voulu se charger de ces interprétations.

Les cellules ascitiques, après coloration, sont polynucléées . Les noyaux, volumineux, présentent de nombreux nucléoles et sont fréquemment en mitose. On observe quelques vacuoles de nature indéterminée. Elles ne se colorent pas au violet de méthyle mais se colorent au Soudan III, ce qui pourrait traduire la présence de lipides.

Souris sarcomateuses traitées par A_{II}. On ne constate pratiquement aucune différence entre les tumeurs des souris traitées par A_{II} et celles des souris non traitées. En particulier, on n'observe pas d'encapsulation ni d'autre réaction de défense, pas de nécrose périvasculaire, ni de différence dans le volume total de la tumeur. Ceci confirme les résultats donnés par l'étude de la répartition des décès.

II - RECHERCHE D'UNE ACTION EVENTUELLE DE A_{II} SUR LE SARCOME DE ROUS *.

MODE OPERATOIRE

Technique expérimentale

1) Témoins d'activité. On a pris seize poulets, agés de cinq à dix jours, qu'on a inoculés au jour J à l'aide du virus du sarcome de Rous **,

* Ces essais ont été effectués à l'Institut Mérieux, Marcy l'Etoile (Rhône) dans le service du Docteur TRIAU que nous sommes heureux de remercier .

** On trouvera l'historique de cette tumeur dans l'ouvrage de STEWART et coll.(46I)

pool 23, conservé à -180°C . La dose utilisée était de 0,1 ml d'une suspension diluée à 10^{-1} , dans du soluté A du PBS *, l'inoculation étant faite par voie sous cutanée, au niveau de la membrane alaire. On a commencé à traiter les animaux avec de l'Endoxan - Asta, per os (comprimés dragéifiés à 50 mg de cyclophosphamide, flacon n° 398), dès l'apparition des tumeurs, soit à J + 7 jours. Les poulets ont alors été divisés en quatre groupes de quatre sujets. Le premier groupe a reçu un comprimé par jour pendant six jours. Le deuxième groupe a avalé un comprimé tous les deux jours (trois fois). Le troisième groupe a reçu un comprimé tous les trois jours (deux fois). Le quatrième groupe a servi de témoins non traités (cf. tableau I5).

2) Animaux traités par A_{II} en suspension huileuse. Seize poulets, âgés de cinq à dix jours, ont été inoculés au jour J à l'aide du sarcome de Rous, dans les mêmes conditions que précédemment. A partir de J + 9, et pendant sept jours consécutifs, trois groupes de quatre poulets ont reçu quotidiennement, par voie intrapéritonéale, sept injections successives de A_{II} en suspension dans 1 ml d'huile d'olive. Les doses de A_{II} utilisées à chaque injection étaient de $200. 10^{-6}\text{g}$ pour le premier groupe, $40. 10^{-6}\text{g}$ pour le deuxième groupe, $8. 10^{-6}\text{g}$ pour le troisième groupe. Le quatrième groupe a reçu 1 ml d'huile d'olive neutralisée et stérilisée, ne contenant pas de A_{II} et a servi de témoin (cf. tableau I6).

3) Animaux traités par A_{II} en suspension aqueuse. Seize poulets ont été inoculés au jour J à l'aide du sarcome de Rous, trois groupes de quatre animaux ont reçu quotidiennement, de J + 7 à J + 13, sept injections successives de A_{II} en suspension dans 1 ml de solution aqueuse de Subtosan à 3,5 p.100, par voie intrapéritonéale. Les doses utilisées à chaque injection étaient de $500. 10^{-6}\text{g}$ pour le premier groupe, $100. 10^{-6}$ pour le deuxième groupe, $20. 10^{-6}$ pour le troisième groupe. Un quatrième groupe a reçu 1 ml de solution à 3,5 p.100 de Subtosan ne contenant pas de A_{II} et servait de témoin (cf. tableau I7).

* Soluté A du PBS = Na Cl : 80 g, K Cl : 2 g, $\text{Na}_2 \text{H PO}_4$, $12 \text{ H}_2\text{O}$: 29 g,
 $\text{K H}_2 \text{ PO}_4$: 2 g, eau distillée : 750 ml.

Comme la dose de $500. 10^{-6}$ g paraissait efficace, nous avons refait cette expérience avec vingt poulets répartis en quatre groupes de cinq animaux. Le protocole expérimental était identique au précédent, mais les doses de A_{II} injectées étaient de $500. 10^{-6}$ g pour le premier groupe, $1000. 10^{-6}$ g pour le deuxième groupe, et $2000. 10^{-6}$ g pour le troisième groupe. Pour ce dernier groupe, la dose était contenue dans 2 ml de solution de Subtosan (cf. tableau I8).

Parallèlement nous avons recherché l'effet éventuel de ces mêmes doses, mais en ne pratiquant qu'une seule injection intrapéritonéale (cf. tableau I9).

Evaluation de l'efficacité.

Les animaux ont été pesés quotidiennement pendant la durée de l'expérience. Les dimensions des tumeurs ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse, ce qui a permis de déterminer le volume moyen de la tumeur pour chaque groupe de poulets. Pour évaluer l'efficacité du traitement, on a calculé le rapport du volume moyen de la tumeur des animaux traités au volume moyen de la tumeur des animaux témoins. Les résultats est considéré comme positif lorsque ce rapport est inférieur ou égal à 0,75.

Nous avons d'autre part noté la date de décès de chacun des animaux, afin de rechercher si les poulets traités vivaient plus longtemps que les témoins non traités.

R E S U L T A T S

Les résultats des injections répétées de A_{II} sont donnés par les tableaux I6, I7, et I8. Seuls les poulets ayant reçu sept injections de $500 \cdot 10^{-6}$ g de A_{II} , en suspension aqueuse, ont eu une évolution tumorale sensiblement freinée et non accompagnée de perte de poids (tableau I7). C'est pourquoi nous avons repris ces essais avec des doses plus importantes de A_{II} (tableau I8). Ceux-ci n'ont pas confirmé les premiers résultats obtenus.

Lorsque A_{II} est administré à forte dose, mais en une seule injection, les tumeurs n'évoluent pas plus lentement que celles des animaux témoins (tableau I9).

Enfin, si l'on compare les dates des décès des animaux traités par A_{II} à celles des décès des animaux témoins, on constate que le traitement n'a nullement prolongé la vie des poulets sarcomateux (figure 27).

C O N C L U S I O N

La fraction lipidique A_{II} ne manifeste aucune activité antitumorale vis à vis du sarcome de Rous.

Numéro du groupe	J + 7		J + 10		J + 14		Efficacité
	Volume moyen des tumeurs	Poids moyen des poulets	Volume moyen des tumeurs	Variation de poids	Volume moyen des tumeurs	Variation de poids	
I	1,3 ml	138 g	5 ml	- 12 g	3,4 ml	- 7 g	0,06 + .
2	2,6 ml	139 g	8,9ml	- 10 g	5,6 ml	+ 6 g	0,103 + .
3	1,9 ml	141 g	6,6 ml	+ 3 g	7,5 ml	+ 5 g	0,137 + .
4	5 ml	132 g	18,5 ml	+ 46 g	54 5 ml	+16 g	I .

Tableau 15 - Témoins d'activité - Action de l'Endoxan sur les poulets sarcomateux.

Jour J = inoculation du sarcome
J + 7 = début du traitement

Numéro du groupe	Quantité de A _{II} par injection	J + 9		J + I4		J + I7		Efficacité	
		Volume moyen des tumeurs	Poids moyen des poulets	Volume moyen des tumeurs	Variation de poids	Volume moyen des tumeurs	Variation de poids	Rap. traités témoins	Evaluation
I	200.10 ⁻⁶ g	0,3 ml	I42 g	I8,8 ml	+ 45 g	35,8 ml	+ 40 g	0,76	-
2	40. 10 ⁻⁶ g	0,1 ml	I66 g	I7,6 ml	+ 64 g	47 ml	+ 38 g	I	-
3	8. 10 ⁻⁶ g	0,6 ml	I56 g	I7 ml	+ 63 g	51 ml	+ 35 g	I,08	-
4	0	0,9 ml	I56 g	25,3 ml	+ 53 g	47,3 ml	+ I6 g	I	-

Tableau I6 - Action des injections de A_{II} en suspension huileuse sur les poulets sarcomeux.

Jour J = inoculation du sarcome

J + 9 = début du traitement

Numéro du groupe	Quantité de A _{II} par injection	J + 7		J + 10		J + 14		Efficacité	
		Volume moyen des tumeurs	Poids moyen des poulets	Volume moyen des tumeurs	Poids moyen des poulets	Volume moyen des tumeurs	Variation de poids	Rap. traités témoin	Evaluation
1	500.10 ⁻⁶ g	0,56 ml		5,8 ml	132 g	20,2 ml	+ 33 g	0,49	+
2	100.10 ⁻⁶ g	0,65 ml		7,8 ml	162 g	39 ml	+ 75 g	0,94	-
3	20.10 ⁻⁶ g	0,60 ml		10 ml	184 g	31,8 ml	+ 30 g	0,76	-
4	0	0,40 ml		10 ml	207 g	41,6 ml	+ 56 g	I	

Tableau I7 - Action des injections de A_{II} en suspension aqueuse sur les poulets sarcomateux.

Jour J = inoculation du sarcome

J + 7 = début du traitement

Numéro du groupe	Quantité de A _{II} par injection	J + 7		J + IO		J + I4		Efficacité
		Volume moyen des tumeurs	Poids moyen des poulets	Volume moyen des tumeurs	Variation de poids	Volume moyen des tumeurs	Variation de poids	
I	500.10 ⁻⁶ g	I ml	I69 g	4,9 ml	+ I9 g	47 ml	+ 45 g	I,7 - -
2	IOOO.10 ⁻⁶ g	3,7 ml	I34 g	I3,5 ml	+ 35 g	39,2 ml	+ 46 g	I,7 - -
3	2000.10 ⁻⁶ g	I ml	I59 g	4,6 ml	+ 20 g	39,6 ml	+48,5g	I,8 - -
4	0	I,7 ml	I34 g	8,9 ml	+ 38 g	27 ml	+42,5g	I - -

Tableau I8 - Action des injections de A_{II} en suspension aqueuse sur les poulets sarcomeux (suite)

Jour J = inoculation du sarcome

J + 7 = début du traitement

Numéro du groupe	Quantité totale de A _{II} injectée	J + 7		J + 10		J + 14		Efficacité
		Volume moyen des tumeurs	Poids moyen des poulets	Volume moyen des tumeurs	Accroiss ^t poids	Volume moyen des tumeurs	Accroiss ^t poids	
I	500.10 ⁻⁶ g	0,9 ml	146 g	10,5 ml	+ 46 g	38 ml	+23,5 g	I, 4 -
2	1000.10 ⁻⁶ g	1,8 ml	137 g	11,5 ml	+ 43 g	43 ml	+ 17 g	I, 6 -
3	2000.10 ⁻⁶ g	2,9 ml	132 g	19,5 ml	+ 32 g	Tous morts	-	-
4	0	1,7 ml	134 ml	8,9 ml	+ 38 g	27 ml	+42,5 g	I

Tableau 19 - Action d'une injection unique de A_{II} en suspension aqueuse sur les poulets sarcomateux.

Jour J = inoculation de la tumeur
J + 7 = début du traitement

Fréquence Injections			DATE DES DECES				
Nature Suspension			Dose A _{II} (10 ⁻⁶ g)				
			J+10	J+15	J+20	J+25	J+30
Injection unique	suspension aqueuse	2000	x x x	x			
		1000		x	x	x	
		500			x		
7 Injections quotidiennes	suspension huileuse	200		x	x		
		40			x	x	x
		8		x			
		0				⊕	⊕
	suspension aqueuse	2000		x		x	x
		1000		x	x	x	
		500	x		x	x	x
		100		x		x	
		20		x	x		
		0		⊕	⊕	⊕	
		aucune injection	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

Figure 27 - Influence des injections de A_{II} sur l'évolution du sarcome de Rous chez le poulet.

D I S C U S S I O N

Nous avons donc isolé la fraction dite "lipide A" de la souche O-90I d'Eberthella typhi, en soumettant à une hydrolyse chlorhydrique ménagée le lipopolysaccharide extrait à partir des bactéries entières par le procédé phénol-eau à froid. Le produit obtenu a été fractionné par chromatographie sur colonne d'acide silicique, ce qui nous a permis de séparer le constituant phospholipidique principal que nous désignons sous le nom de lipide A_{II}. Il s'agit d'un phosphomucolipide constitué essentiellement de restes de glucosamine, d'acide phosphorique et des acides laurique, myristique et β hydroxymyristique.

Nos résultats analytiques ne sont pas en contradiction avec ceux obtenus par d'autres auteurs, particulièrement ceux de NOWOTNY (232, 235) et ceux de BURTON et CARTER (67). Ces auteurs ont étudié des lipides provenant d'Escherichia coli, c'est à dire d'une espèce différente de celle sur laquelle nous avons travaillé. Les préparations qu'ils ont obtenues présentent en général une teneur en glucosamine légèrement supérieure à celle de A_{II}. La fraction peptidique s'y trouve également en proportion plus importante; mais cette différence peut être rapportée au fait que nous avons dosé les acides aminés par une méthode plus spécifique que la technique à la ninhydrine généralement utilisée. Cette dernière conduit en effet à d'importantes erreurs par excès (58, 59).

La présence d'acide palmitoléique dans la fraction A_{II} mérite d'être soulignée, car cet acide n'est pas ordinairement considéré comme un constituant habituel du lipide A, quoique BURTON et CARTER (67) aient également

trouvé une petite quantité d'acide insaturé en C_{16} dans le lipide A d'Escherichia coli et qu'un tel acide ait été signalé à maintes reprises dans de nombreuses espèces à Gram négatif (462-465). Nous l'avons nous même caractérisé dans les lipides non liés de l'endotoxine d'Eberthella typhi 0-90I (88).

Une autre différence entre la fraction A_{II} et les divers lipides A précédemment décrits réside dans l'absence de groupements acétyles dans notre préparation.

L'étude du comportement chromatographique de A_{II} , en particulier sur couches minces d'acide silicique, révèle que ce lipide n'est pas homogène mais constitué de plusieurs fractions ayant une composition chimique voisine. Il est vraisemblable qu'il en est de même pour les préparations de lipides A qui ont été décrites par certains auteurs comme étant chromatographiquement homogènes (235, 209). Ceux-ci ont en effet travaillé sur papier silicé en utilisant des procédés peu efficaces pour révéler les chromatogrammes. Leurs produits, en tout état de cause, donnaient des taches très allongées. Il semble d'ailleurs que les améliorations apportées à cette technique par NOWOTNY et coll. (222), ainsi que l'utilisation de la chromatographie sur couches minces (233) aient sonné le glas de bien des illusions dans ce domaine. Notons toutefois qu'il convient d'être prudent dans l'interprétation des résultats chromatographiques, car l'étude de A_{II} montre que ces lipides sont peu stables.

Dans ces conditions, il n'était pas question que nous nous engagions dans la voie de la détermination de la structure moléculaire de notre fraction. Une telle étude ne pourra d'ailleurs être entreprise d'une façon valable que le jour où l'on disposera d'un enzyme spécifique capable de couper sélectivement la liaison entre le lipide A et le polysaccharide de l'endotoxine.

Nous avons recherché dans quelle mesure la fraction lipidique A_{II} pouvait induire chez l'animal certaines des réactions caractéristiques observées après injection de l'endotoxine.

Les injections de A_{II} sont parfaitement tolérées par le singe, le lapin et le cobaye, quelle que soit la voie d'inoculation choisie. Contrairement à l'endotoxine qui est extrêmement toxique, A_{II} peut être injectée à la souris par voie intrapéritonéale à la dose de 3 mg sans provoquer de troubles graves. Toutefois, ces injections ont un effet létal lorsqu'on les répète quotidiennement à des doses supérieures à $100 \cdot 10^{-6}$ g. Chez le lapin, le pouvoir pyrogène de A_{II} est environ 10.000 fois plus faible que celui de l'endotoxine correspondante.

Des injections répétées de A_{II} à des singes (Cynocephalus babuin), par voie intraveineuse, n'induisent pas chez ces derniers la formation d'anticorps spécifiques de l'antigène O, ce qui prouve que le lipide n'est pas contaminé par des traces d'endotoxine. D'autre part, il n'est pas possible de mettre en évidence par la technique de la déviation du complément, la présence d'anticorps anti A_{II} dans le sérum de ces animaux. Ce résultat ne fait que confirmer une constatation générale, car s'il est bien connu que certains lipides peuvent jouer le rôle d'haptène, il ne semble pas qu'ils puissent se comporter comme des antigènes (466). Dans le cas des bactéries, en particulier, les fractions lipidiques purifiées paraissent dépourvues d'activité immunisante (cf. 205).

En revanche, la déviation du complément a montré que la fraction A_{II} manifestait un pouvoir anticomplémentaire marqué. KASAI et coll. (467) ont déjà noté que le lipide A d'Escherichia coli possédait la même propriété à faible dose; il s'agit là d'un phénomène non spécifique qui a pu être observé avec d'autres phospholipides, en particulier le cardiolipide. Selon RAPPORT (466), cette propriété pourrait être liée au caractère acide de ces constituants.

COLOBERT et coll. (468) ont constaté que les injections de vaccin antityphoparatyphoïdique A et B provoquent une élévation progressive et considérable du taux de l'obsistine chez le singe. Ils ont en outre établi que ce système lytique participe de manière active à la réaction de l'organisme contre une tentative d'infection per os, indépendamment de la production des anticorps agglutinants. Puisque l'injection de lipide A provoque une élévation du niveau d'immunité non spécifique chez les animaux, nous avons pensé que celle-ci pouvait être liée à l'augmentation du taux d'obsistine observée au cours de la vaccination.

En fait, les résultats obtenus chez les singes après injections intraveineuses de 3 mg de lipide A_{II} ne sont pas concluants, puisque le taux d'obsistine varie d'une façon très irrégulière entre deux injections et que les variations observées sont loin d'être parallèles pour tous les animaux. Lorsque la dose injectée est très élevée (15 mg) les propriétés lytiques du sérum ne subissent même aucune modification sensible.

Toutefois, avant de conclure définitivement à une absence de relation entre l'injection du lipide A_{II} et le taux d'obsistine, il nous paraît nécessaire de rappeler les études consacrées plus récemment à ce facteur lytique par FEITZ (469) puis par CIRODDE (470). Selon le premier, le sérum sanguin peut être fractionné en deux parties, par relargage par les phosphates, en portant la concentration molaire en phosphates à 1,5 M, puis en élevant cette concentration à la valeur 2,5 M. Ces fractions désignées par les symboles F₁ et F₂ sont isolément inactives, mais leur réunion restaure l'activité lytique primitive du sérum. Il existe une proportion relative optimale entre ces deux fractions assurant une lyse maximale de la suspension bactérienne de référence.

CIRODDE (470) a étudié parallèlement la variation du taux de l'obsistine et des fractions F₁ et F₂ au cours et au décours de la vaccination associée antidiptérique - antitétanique - antityphoparatyphoïdique chez

l'homme. Il a pu observer que la répétition des injections au cours de la vaccination provoque chez un nombre élevé de sujets une chute marquée du taux de l'obsistine, cette chute devant être rapportée à un déséquilibre dans les proportions relatives des divers facteurs humoraux entrant en jeu dans le système complexe de l'obsistine. La correction de ce déséquilibre par addition de fractions protéiniques du sérum, correspondant à certains des facteurs seulement, restaure en effet une puissante activité lytique très supérieure à celle existant avant la vaccination.

Il est possible que les irrégularités observées dans les variations du taux d'obsistine chez les singes après injection de A_{II} soient la conséquence d'une modification du rapport optimal existant entre F_1 et F_2 .

Il aurait été particulièrement intéressant de rechercher si les singes qui avaient reçu des injections de A_{II} pouvaient résister à une infection expérimentale, mieux que les animaux témoins n'ayant pas reçu ce lipide. Malheureusement, il est extrêmement difficile de reproduire chez ces animaux une affection analogue aux fièvres typhoïde et paratyphoïde humaines *. C'est pourquoi nous avons recherché l'apparition d'une immunité éventuelle chez les singes par l'épreuve de séroprotection sur la souris. Cette expérience a montré que les sérums des singes qui avaient reçu des injections de A_{II} ne contiennent aucun facteur capable de protéger la souris vis à vis d'une dose mortelle d'Eberthella typhi Ty 2.

* Toutes nos tentatives de production d'une salmonellose chez les singes par injection d'une culture dans un ganglion mésentérique, suivant la méthode préconisée par REILLY, se sont soldées par des échecs.

Il restait à déterminer dans quelle mesure l'injection de A_{II} à des souris pouvait modifier le niveau de l'immunité non spécifique chez ces dernières. En fait, si l'on injecte à ces animaux, par voie intrapéritonéale, $50 \cdot 10^{-6}$ g de ce lipide, plus de 50 p.100 d'entre eux résistent à une dose mortelle d'Eberthella typhi Ty 2, administrée quatre jours après la fraction A_{II} . Cette protection conférée par le lipide ne peut être attribuée à la présence d'anticorps spécifiques, puisque A_{II} ne se comporte pas comme un antigène ni comme un haptène et que d'autre part la souche d'épreuve utilisée possède un antigène Vi masquant complètement l'antigène O.

L'étude des propriétés dites "adjuvantes" de A_{II} s'est révélée particulièrement intéressante. En effet, lorsqu'on injecte ce lipide à des lapins par voie intrapéritonéale en association avec la sérum-albumine humaine (SAH), le taux d'anticorps obtenu est supérieur à celui que l'on obtient en utilisant l'adjuvant complet de Freund, les corps bactériens entiers d'Eberthella typhi ou le lipopolysaccharide extrait à partir de ces derniers.

Nos résultats doivent être rapprochés de ceux de FARTHING et HOLT (353, 354). Ces auteurs avaient déjà constaté que les lipides A bruts extraits de Bordetella pertussis et d'Echerichia coli stimulent la production d'antitoxines chez le cobaye, lorsqu'on les injecte en même temps que l'anatoxine diphtérique. Toutefois, contrairement à ce que nous avons observé dans le cas de la fraction A_{II} , ces lipides A bruts, bien qu'étant les seules fractions actives des lipopolysaccharides, n'ont pas permis d'obtenir des taux d'anticorps aussi élevés qu'avec les endotoxines correspondantes, même lorsque les doses de lipides utilisées étaient importantes. FARTHING et HOLT (353, 354) pensent que la différence d'activité observée entre les lipides et les lipopolysaccharides pourrait s'expliquer par le fait que les premiers ont un poids moléculaire plus faible et se dispersent plus difficilement que les seconds; mais ils n'excluent pas l'hypothèse

d'une dégradation survenue au cours de l'hydrolyse acide.

Il convient également de noter que si la fraction A_{II} nous a donné des taux d'anticorps anti-SAH particulièrement élevés, il est cependant assez difficile d'établir une comparaison valable entre le pouvoir adjuvant de cette fraction et celui du lipopolysaccharide correspondant. En effet, ce dernier n'a pas pu être utilisé aux mêmes doses que le lipide, du fait de sa très grande toxicité. D'autre part, on pouvait difficilement s'attendre à un parallélisme étroit entre nos résultats et ceux de FARTHING et HOLT (353, 354), car ces auteurs ont utilisé un antigène et des adjuvants différents des nôtres; de plus, ils ont choisi le cobaye comme animal d'épreuve. Or, comme nous l'avons souligné dans la partie bibliographique, les réponses diffèrent suivant l'espèce animale utilisée. Il semble en particulier que le lapin soit plus sensible que le cobaye à l'action adjuvante des lipopolysaccharides (346, 354).

Il existe en revanche un point sur lequel nos conclusions concordent parfaitement avec celles de FARTHING et HOLT (353, 354), c'est l'absence de parallélisme entre la toxicité et le pouvoir adjuvant. Nous avons vu en effet que la fraction A_{II} est très faiblement pyrogène et peu toxique. Ces résultats rejoignent également ceux de NOWOTNY et JOHNSON (219, 280), selon lesquels les endotoxines partiellement détoxifiées conservent la propriété de stimuler la production des anticorps.

Notons enfin qu'on retrouve dans A_{II} un résidu peptidique lié à un glycolipide, c'est à dire la combinaison qui, selon WHITE et coll. (363), serait nécessaire pour qu'un lipide manifeste des propriétés adjuvantes.

Sachant que les propriétés antitumorales des endotoxines ont pu être attribuées à la présence du lipide A, nous avons recherché si notre fraction A_{II} pouvait modifier l'évolution du sarcome I de la souris ou celui du sarcome de Rous chez le poulet. Quels qu'aient été le mode de dispersion de A_{II} (suspension aqueuse ou huileuse), la fréquence des injections et leur décalage par rapport à l'inoculation du sarcome I, nous n'avons pas constaté de ralentissement du développement des ascites ou des tumeurs, ni de modifications histologiques au niveau de ces dernières. D'autre part, les souris traitées par A_{II} n'ont pas vécu plus longtemps que les souris témoins non traitées. Il semble même que chez certaines d'entre elles la mort soit survenue d'une manière plus précoce.

Les essais effectués sur le sarcome de Rous, qui ont consisté à injecter aux poulets sarcomateux des doses variables de A_{II} en modifiant la fréquence des injections, n'ont donné également que des résultats négatifs.

Il semble donc que notre préparation ne possède aucune propriété antitumorale. Elle différerait sur ce point du lipide A utilisé par WESTPHAL, NETER et coll. (379-380) car ces auteurs ont observé que leur lipide provoquait une nécrose hémorragique au niveau des tumeurs du sarcome I80 de la souris. Nos résultats se distinguent aussi de ceux de KASAI et coll. (209), puisque ces derniers ont montré que des injections répétées de lipide A brut pouvaient, dans certains cas, empêcher le développement de la forme ascitique du carcinome d'Ehrlich.

Il convient toutefois de noter que notre fraction A_{II} diffère des lipides A précédents par son origine et par son mode de purification, et que nos essais ont été effectués avec des souches tumorales et animales différentes de celles des autres auteurs. De plus, il n'est pas inutile de rappeler que la nécrose hémorragique des tumeurs n'est pas spécifique du lipide A et ne correspond pas nécessairement à un effet inhibiteur. Il est possible que les résultats obtenus avec A_{II} eussent été différents si nous avions utilisé d'autres souches animales, mais ceci aurait soulevé le problème

délicat de l'adaptation de la souche tumorale aux espèces utilisées. Il aurait été également intéressant de rechercher dans quelle mesure l'injection de A_{II} modifie l'activité du système réticuloendothélial chez les souris BALB/c. Selon HALPERN et coll. (465), il existerait en effet un parallélisme entre l'intensité de la réponse du S.R.E. et l'augmentation de la résistance naturelle au développement des tumeurs.

Bien qu'on ne connaisse pas encore la relation entre la structure chimique et les propriétés antitumorales de certaines substances d'origine bactérienne, on ne peut s'empêcher de faire un rapprochement entre l'absence de propriétés antitumorales de A_{II} et la disparition des groupements acétyles. Notons à ce propos qu'à notre connaissance on n'a jamais vérifié si les endotoxines détoxifiées conservaient leur pouvoir inhibiteur vis à vis des tumeurs. Il convient également de signaler que, selon MESROBEANU et coll. (183), la lipoprotéine qui dérive de l'endotoxine O complète serait toxique pour les cellules tumorales, alors que le complexe glucido-lipido-protéinique, le lipopolysaccharide et le lipide A ne posséderaient pas cette propriété.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de l'étude des propriétés biologiques de la fraction A_{II} semblent d'ailleurs appuyer les conceptions de ces auteurs, selon lesquelles les propriétés essentielles du lipide A se limiteraient au pouvoir adjuvant et à l'augmentation de la résistance non spécifique aux infections. Toutefois, il importe d'être très prudent avant de minimiser le rôle du lipide A dans les autres propriétés de l'endotoxine. Comme l'a souligné fort justement NOWOTNY (222), il ne faut pas oublier que ce lipide est libéré de l'antigène O par hydrolyse acide et qu'on n'est donc pas certain de l'obtenir sous sa forme native. Le problème ne pourra être définitivement résolu que le jour où l'on pourra obtenir un lipide intact et exempt d'autres constituants.

C O N C L U S I O N S

Nous avons isolé le lipide A d'Eberthella typhi 0-90I, par le moyen d'une hydrolyse chlorhydrique ménagée du lipopolysaccharide extrait des bactéries entières par une émulsion phénol-eau à froid.

Le lipide A brut a été fractionné par chromatographie sur colonne d'acide silicique, ce qui nous a permis de séparer le constituant phospholipidique principal, auquel nous avons donné le nom de A_{II}.

Il s'agit d'un phosphomucolipide constitué essentiellement de restes de glucosamine, d'acides phosphorique, laurique, myristique, palmitoléique et β hydroxymyristique et de petites quantités d'oses et d'acides aminés. Ce phospholipide est totalement dépourvu de groupements acétyles.

La fraction lipidique A_{II} est peu toxique pour la souris et très faiblement pyrogène chez le lapin.

Injectée au singe (Cynocephalus babuin) par voie intraveineuse, elle ne fait pas apparaître dans le sérum de ce dernier d'anticorps capables d'agglutiner les germes entiers ni d'anticorps anti - A_{II} décelables par la déviation du complément. En revanche, elle manifeste, in vitro, un pouvoir anticomplémentaire marqué.

Les injections intraveineuses de A_{II} ne provoquent aucune augmentation significative du taux d'obsistine chez le singe et n'induisent pas l'apparition dans le sérum de cet animal de facteurs capables de protéger la souris vis à vis d'une infection expérimentale. Cependant, lorsqu'on

l'injecte à la souris par voie intrapéritonéale, le lipide A_{II} augmente considérablement le niveau de l'immunité non spécifique.

Injecté au lapin par voie intrapéritonéale, en association avec la sérum - albumine humaine, A_{II} se comporte comme un adjuvant supérieur à l'adjuvant complet de Freund, aux corps bactériens entiers d'Eberthella typhi et au lipopolysaccharide extrait à partir de ces derniers.

La fraction lipidique A_{II} ne manifeste aucune propriété antitumorale chez la souris porteuse du sarcome I ni chez le poulet inoculé à l'aide du sarcome de Rous.

Nos résultats présentent des analogies avec ceux des autres auteurs qui ont étudié des lipides A provenant de diverses espèces bactériennes. Des différences s'observent toutefois; elles peuvent être liées à la notion d'espèce mais, plus probablement, aux conditions expérimentales.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(par ordre d'arrivée dans le texte)

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I

- I - COLOBERT (L.) et CREACH (O.) - La paroi ectoplasmique des bactéries.
Path. Biol., 1961, 9 (361-386).
- 2 - PERKINS (H.R.) - Chemical structure and biosynthesis of bacterial cell walls.
Bact. Rev., 1963, 27, (18-55).
- 3 - SALTON (M.R.J.) - The bacterial cell - wall.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New-York, 1964, 293 pages.
- 4 - MARTIN (H.H.) und FRANK (H.) - Die Mucopetid - Grundstruktur in der Zellwand gramnegativer Bakterien.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 1962, 184, (306-311).
- 5 - HOUWINK (A.L.) - A macromolecular monolayer in the cell wall of Spirillum species.
Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, (360-366).
- 6 - HOUWINK (A.L.) - Flagella, gas vacuoles and cell-wall structure in Halobacterium; an electron microscope study.
J. Gen. Microbiol., 1956, 15, (146-150).
- 7 - SALTON (M.R.J.) - Bacterial cell walls.
in "Bacterial anatomy" SPOONER (E.T.C.) and STOCKER (B.A.D.) edit,
Cambridge University Press, 1956, p.81-110.
- 8 - SALTON (M.R.J.) - Bacterial cell walls.
Bacterial anat., 6 th Symposium, Soc. Gen. Microbiol. London,
1956, p.215-260.
- 9 - SALTON (M.R.J.) and WILLIAMS (R.C.) - Electron microscopy of the cell walls of Bacillus megatherium and Rhodospirillum rubrum.
Biochim. Biophys. Acta, 1954, 14, (455-458).

- I0 - SALTON (M.R.J.) and HORNE (R.W.) - Studies of the bacterial cell wall.-
II. Methods of preparation and some properties of cell walls.
Biochim. Biophys. Acta, 1951, 7, (177-197).
- II - BISSET (K.A.) - The cytology and life-history of bacteria.
E. and S. Livingstone édit., Edinburgh, London 1955.
- I2 - BLADEN (H.A.) and MERGENHAGEN (S.E.) - Ultrastructure of Veillonella
and morphological correlation of an outer membrane with particles
associated with endotoxic activity.
J. Bacteriol., 1964, 88, (1482-92).
- I3 - MURRAY (R.G.E.)
in Soc. Gen. Microbiol. Symposium, 1962, 12, 119. cité par SALTON (3).
- I4 - HICKMAN (D.D.) and FRENKEL (A.W.) - The structure of "Rhodospirillum
rubrum".
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1959, 6, (277-284).
- I5 - BROWN (A.D.) and SHOREY (C.D.) - Preliminary observations on the cell
envelopes of two species of Halobacterium.
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 59, (258-260).
- I6 - CHAPMAN (G.B.) - Electron microscopy of ultrathin sections of bacteria -
III. Cell wall, cytoplasmic membrane, and nuclear material.
J. Bacteriol., 1959, 78, (96-104).
- I7 - MURRAY (R.G.E.) - On the cell wall structure of Spirillum serpens.
Can. J. Microbiol., 1963, 9, (381-92).
- I8 - KELLENBERGER (E.) and RYTER (A.) - Cell wall and cytoplasmic membrane
of Escherichia coli.
J. Biochem. Biophys. Cytol., 1958, 4, (323-326).
- I9 - BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.) - Contribution à l'étude de la composi-
tion chimique des bactéries. Les substances phosphorées au cours de
l'autolyse bactérienne.
C.R. Soc. Biol., 1933, 112, (611-613).
- 20 - BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.) - Contribution à l'étude de la composi-
tion chimique des bactéries. Action des électrolytes sur l'équilibre
des substances phosphorées de la cellule bactérienne.
C.R. Soc. Biol., 1933, 112, (1009-1011).
- 21 - BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.) - Technique de la préparation des poly-
saccharides microbiens spécifiques.
C.R. Soc. Biol., 1933, 113, (490-492).
- 22 - BOIVIN (A.), MESROBEANU (I.) et MESROBEANU (L.) - Extraction d'un com-
plexe toxique et antigénique à partir du Bacille d'Aertrycke.
C.R. Soc. Biol., 1933, 114, (307-310).

- 23 - BOIVIN (A.) - Les toxines bacteriennes, leur nature chimique, leur origine, leur signification biologique.
Exp. Ann. de Biochimie Médicale, Masson et Cie Paris, 1942, 3, (113-133).
- 24 - WAGNER-JAUREGG (Th.) - Die beiden der Ruhrbacillen.
Angew. Chem., 1942, 55, (21-24).
Die Endotoxine der Bakterien.
Angew. Chem., 1940, 53, (319-321).
- 25 - DAVIES (D.A.L.) - A specific polysaccharide of Pasteurella pestis.
Biochem. J., 1956, 63, (105-116).
- 26 - RAISTRICK (H.) and TOPLEY (W.W.C.) - Immunizing fractions isolated from Bact. aertryckz.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1934, 15, (113-130).
- 27 - FREEMAN (G.G.), CHALLINOR (S.W.) and WILSON (J.) - Use of synthetic medium in isolation of somatic antigens of Bacterium typhi murium and Bacterium typhosum.
Biochem. J., 1940, 34, (307-324).
- 28 - FREEMAN (G.G.) and ANDERSON (T.H.) - The hydrolytic degradation of the antigenic complex of Bact. typhosum Ty 2.
Biochem. J., 1941, 35, (564-77).
- 29 - FREEMAN (G.G.) - Preparation and properties of specific polysaccharide from Bact. typhosum Ty 2.
Biochem. J., 1942, 36, (340-355).
- 30 - FREEMAN (G.G.) - The components of the antigenic complex of Salmonella typhimurium.
Biochem. J., 1943, 37, (601-617).
- 31 - MILES (A.A.) and PIRIE (N.W.) - The properties of antigenic preparations from Brucella melitensis : I. Chemical and physical properties of bacterial fractions.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1939, 20, (83-98).
- 32 - MORGAN (W.T.J.) - Studies in immuno-chemistry; isolation and properties of specific antigenic substance from B. dysenteriae (Shiga).
Biochem. J., 1937, 31, (2003-2021).
- 33 - MORGAN (W.T.J.) and PARTRIGE (S.M.) - Studies in immunochemistry - IV. The fractionation and nature of antigenic material isolated from Bact. dysenteriae (Shiga).
Biochem. J., 1940, 34, (169-191).
- 34 - MORGAN (W.T.J.) and PARTRIDGE (S.M.) - Studies in immunochemistry. VI. The use phenol and of alkali in degradation of antigenic material isolated from Bact. dysenteriae (Shiga).
Biochem. J., 1941, 35, (1140-1163).

- 35 - MORGAN (W.T.J.) and PARTRIDGE (S.M.) - Examination of O antigenic complex of Bact. typhosum.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1942, 23, (151-165).
- 36 - DAVIES (D.A.L.), MORGAN (W.T.J.) and MOSIMANN (W.) - Studies in immunochemistry - I3 Preparation and properties of the "O" somatic antigen of Shigella dysenteriae (Shiga).
Biochem. J., 1954, 56, (572-581).
- 37 - HENDERSON (D.W.) and MORGAN (W.T.J.) - Isolation of antigenic substances from strains of Bact. typhosum.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1938, 19, (82-94).
- 38 - GOEBEL (W.F.), BINKLEY (F.) and PERLMAN (E.) - Studies on the Flexner group of dysentery bacilli. I. The specific antigens of Shigella parady-senteriae.
J. Exptl. Med., 1945, 81, (315-330).
- 39 - BAKER (E.E.), GOEBEL (W.F.) and PERLMAN (E.) - Specific antigens of variants of Shigella sonnei.
J. Exptl. Med., 1949, 89, (325-338).
- 40 - RIBI (E.), MILNER (K.C.) and PERRINE (T.D.) - Endotoxic and antigenic fractions from the cell wall of Salmonella enteritidis.
J. Immunol., 1959, 82, (75-84).
- 41 - RIBI (E.), HASKINS (W.T.), LANDY (M.) and MILNER (K.C.) - Preparation and host reactive properties of endotoxin with low content of nitrogen and lipid.
J. Exptl. Med., 1961, 114, (647-663).
- 42 - RIBI (E.), ANACKER (R.L.), FUKUSHI (K.), HASKINS (W.T.), LANDY (M.) and MILNER (K.C.) - Relationship of chemical composition to biological activity. in "Bacterial endotoxins" LANDY (M.) and BRAUN (W.) édit., Rutgers University Press, 1964, p. 16-28.
- 43 - WALKER (J.) - Method for isolation of toxic and immunizing fractions from bacteria of Salmonella group.
Biochem. J., 1940, 34, (325-329).
- 44 - ROBERTS (R.S.) - The endotoxin of Bact. coli.
J. Comparat. Pathol. Therapeut., 1949, 59, (284-304).
- 45 - DIGEON (M.), RAYNAUD (M.) et TURPIN (A.) - Etude de la toxine R₂ du bacille typhique (Eberthella typhosa).
Ann. Inst. Pasteur, 1952, 82, (206-220).
- 46 - RAYNAUD (M.) et DIGEON (M.) - Une nouvelle méthode de préparation des endotoxines.
C.R. Acad. Sci. Paris, 1960, 251, (985-986).

- 47 - HOMMA (J.Y.), HAMAMURA (N.), NAOI (M.) et EGAMI (F.) - Recherches chimiques sur l'endotoxine de Pseudomonas aeruginosa II. Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, (647-664).
- 48 - WEIDEL (W.), FRANK (H.) and LEUTGEB(W.) - Autolytic enzymes as a source of error in the preparation and study of Gram-negative cell-walls. J. Gen. Microbiol., 1963, 30, (53-58).
- 49 - PALMER (J.W.) and GERLOUGH (T.D.) - Simple method for preparing antigenic substances from typhoid bacillus. Science, 1940, 92, (155-156).
- 50 - ROBINSON (E.S.) and FLUSSER (B.A.) - Studies on pyrogens; isolation of pyrogens from various microorganisms. J. Biol. Chem., 1944, 153, (529-534).
- 51 - CO TUI, HOPE (D.), SCHRIFT (M.H.) and POWERS (J.) - Purified pyrogen from Eberthella typhosa; preliminary report on its preparation and its chemical and biologic characteristics. J. Lab. Clin. Med., 1944, 29, (58-62).
- 52 - WESTPHAL (O.), LUDERITZ (O.) und BISTER (F.) - Über die Extraction von Bakterien mit Phenol/wasser. Z. Naturforschg, 1952, 7 b, (148-155).
- 53 - WESTPHAL (O.) - Hot aqueous phenol extraction of Gram negative bacterial lipopolysaccharides. U.S. Patent Office applied for, 1964, n° 3, (148, 120).
- 54 - WESTPHAL (O.) und LUDERITZ (O.) - Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden Gram negative Bakterien. Angew. Chem., 1954, 66, (407-417).
- 55 - WESTPHAL (O.), LUDERITZ (O.), EICHENBERGER (E.) und KEIDERLING (W.) - Über bakterielle Reizstoffe. I - Mitt. : Reindarstellung eines Polysaccharid-Pyrogens aus Bacterium coli. Z. Naturforschg, 1952, 7 b, (536-548).
- 56 - O' NEIL (G.J.) and TODD (J.P.) - Extraction of nucleic-acid free lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria. Nature, 1961, 190, (344-345).
- 57 - NOWOTNY (A.M.), SCOTT (T.), DURON (O.S.) and NOWOTNY (A.) - Relation of structure to function in bacterial O antigens. I. Isolation methods. J. Bacteriol., 1963, 85, (418-426).
- 58 - CREACH (O.) - Contribution à l'étude de la structure de la paroi ectoplasmique d'Eberthella typhi. Thèse de doctorat en Pharmacie de l'Université de Lyon. 1960, n° 479.

- 59 - COLOBERT (L.) et CREACH (O.) - Structure de la paroi ectoplasmique d'Eberthella typhi. Nature et localisation du substrat du lysozyme. Ann. Inst. Pasteur, 1960, 99, (672-694).
- 60 - BARTA (G.) - Soluble protective antigen from Bordetella pertussis prepared with sodium desoxycholate. J. Immunol., 1963, 90, (72-80).
- 61 - RIBI (E.), HASKINS (W.T.), MILNER (K.C.), ANACKER (R.L.), RITTER (D.B.), GOODE (G.), TRAPANI (R.J.) and LANDY (M.) - Physicochemical changes in endotoxin associated with loss of biological potency. J. Bacteriol., 1962, 84, (803-814).
- 62 - ANACKER (R.L.), FINKELSTEIN (R.A.), HASKINS (W.T.), LANDY (M.), MILNER (K.C.), RIBI (E.) and STASHAK (P.W.) - Origin and properties of naturally occurring hapten from Escherichia coli. J. Bacteriol., 1964, 88, (1705-1720).
- 63 - MILNER (K.C.), ANACKER (R.L.), FUKUSHI (K.), HASKINS (W.T.), LANDY (M.), MALMGREN (B.) and RIBI (E.) - Symposium on relation of structure of microorganisms to their immunological properties. III. Structure and biological properties of surface antigens from Gram negative bacteria. Bact. Rev., 1963, 27, (352-368).
- 64 - FUKUSHI (K.), ANACKER (R.L.), HASKINS (W.T.), LANDY (M.), MILNER (K.C.) and RIBI (E.) - Extraction and purification of endotoxin from enterobacteriaceae : A comparison of selected methods and sources. J. Bacteriol., 1964, 87, (391-400).
- 65 - DAVIES (D.A.L.) and MORGAN (W.T.J.) - The undegraded polysaccharide of Shigella dysenteriae (Shiga). Atti del VI Congr. Intern. Microbiol., 1954, 2, (16-17).
- 66 - HASKINS (W.T.), RIBI (E.), LANDY (M.), ANACKER (R.L.) and MILNER (K.C.) - Preparation and properties of an aluminium citrate - endotoxin complex from Salmonella enteritidis. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1963, 112, (113-119).
- 67 - BURTON (A.J.) and CARTER (H.E.) - Purification and characterisation of the lipid A component of the lipopolysaccharides from Escherichia coli. Biochemistry, 1964, 3, (411-418).
- 68 - GRIFFITHS (B.W.), DIENA (B.B.) and GREENBERG (L.) - The separation and purification of Vi and O antigens of S. typhi using a column precipitation technique. Canad. J. Biochem., 1963, 41, (249-259).

- 69 - KUNIN (C.M.), BEARD (M.V.) and HALMAGYI (N.E.) - Evidence for a common hapten associated with endotoxin fractions of Escherichia coli and other Enterobacteriaceae.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1962, III, (160-166).
- 70 - WHANG (H.Y.) and NETER (E.) - Immunological studies of a heterogenetic enterobacterial antigen (KUNIN).
J. Bacteriol., 1962, 84, (1245-1250).
- 71 - SUZUKI (T.), GORZYNSKI (E.A.) and NETER (E.) - Separation by ethanol of common and somatic antigens of Enterobacteriaceae.
J. Bacteriol., 1964, 88, (1240-1243).
- 72 - WHANG (H.Y.) and NETER (E.) - Selective destruction by Pseudomonas aeruginosa of common antigen of Enterobacteriaceae.
J. Bacteriol., 1964, 88, (1244-1248).
- 73 - WILKINSON (J.F.) - The extracellular polysaccharides of bacteria.
Bact. Rev., 1958, 22, (46-73).
- 74 - SALTON (M.R.J.) - Surface layers of the bacterial cell.
in "The bacteria", GUNSALUS (I.C.) and STANIER (R.Y.) edit. Academic Press, 1960, vol.I, (97-151).
- 75 - KELLENBERGER (E.) - The physical state of bacterial nucleus.
in Soc. Gen. Microbiol. Symposium, 1960, 10, 39.
- 76 - WHEAT (R.) - Studies on the nature of bonding between bacterial cell wall polysaccharides.
in "Bacterial endotoxins" LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p.76-80.
- 77 - WEIDEL (W.) and PELZER (H.) - Bagshaped macromolecules - A new outlook on bacterial cell walls.
Adv. in Enzymology, 1964, 26, (193-232).
- 78 - FROMME (I.), LUDERITZ (O.) and WESTPHAL (O.) - Chemische Analyse des Lipopolysaccharides aus Salmonella abortus equi.
Pharm. Acta Helv., 1958, 33, (391-400).
- 79 - JOLLES (P.), SAMOUR (D.) and LEDERER (E.) - Analytical studies on wax D, a macromolecular peptidoglycolipid fraction from human strains of Mycobacterium tuberculosis.
Arch. Biochem. Biophys., 1962, suppl.I, (283-289).
- 80 - KULKARNI (M.V.) and WHEAT (R.W.) - Studies on the in vivo synthesis of cell wall components of Chromobacterium violaceum.
J. Elisha Mitchell Sci. Soc., 1962, 78, (74).

- 81 - GOEBEL (W.F.) and JESAITIS (M.A.) - Somatic antigen of phage resistant variant of phase. II. Shigella sonnei.
J. Exptl. Med., 1952, 96, (425-438).
- 82 - JESAITIS (M.A.) and GOEBEL (W.F.) - Chemical and antiviral properties of somatic antigen of phase. II. Shigella sonnei.
J. Exptl. Med., 1952, 96, (409-424).
- 83 - SCHRAMM (G.), WESTPHAL (O.) und LUDERITZ (O.) - Bacterial irritants. III. Physico-chemical properties of a highly purified coli pyrogen.
Z. Naturforsch., 1952, 76, (594-598).
- 84 - HARTWELL (J.L.), SHEAR (M.J.) and ADAMS (J.R.) - Chemical treatment of tumors. VII. Nature of the hemorrhage - producing fraction from Serratia marcescens (Bacillus prodigiosus) culture filtrate.
J. Nat. Cancer Inst., 1943, 4, (107-122).
- 85 - OROSZLAN (S.I.) and MORA (P.T.) - Dissociation and reconstitution of an endotoxin.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1963, 12, (345-349).
- 86 - MORA (P.T.) and YOUNG (B.G.) - Interaction of an endotoxin with cationic macromolécules.
J. Gen. Microbiol., 1961, 26, (81-95).
- 87 - WEIDEL (W.), FRANK (H.) and MARTIN (H.H.) - The rigid layer of the cell wall of Escherichia coli strain B.
J. Gen. Microbiol., 1960, 22, (158-166).

C H A P I T R E II

- 88 - CREACH (O.), ENTRESSANGLES (B.) et COLOBERT (L.) - Les lipides de la paroi ectoplasmique d'Eberthella typhi - I. Acides gras libres et lipides neutres de l'antigène somatique.
Biochim. Biophys. Acta, 1966, 116, (80-94).
- 89 - MORGAN (W.T.J.) and PARTRIDGE (S.M.) - The properties of antigenic preparations from Brucella melitensis : Chemical and physical properties of bacterial fractions.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1939, 20, (83-98).
- 90 - BINKLEY (F.), GOEBEL (W.F.) and PERLMAN (E.) - Studies on the Flexner group of dysentery bacilli - II. The chemical degradation of the specific antigen of type Z Shigella paradysenteriae (Flexner).
J. Exptl. Med., 1945, 81, (331-347).

- 91 - WESTPHAL (O.) und LUDERITZ (O.) - Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden Gram negativer Bakterien.
Angew. Chem., 1954, 66, (407-417).
- 92 - DAVIES (D.A.L.) - Polysaccharides of Gram negative bacteria.
Adv. Carbohydr. Chem., 1960, 15, (271-340).
- 93 - BURGER (M.) - Bacterial polysaccharides.
Charles C. THOMAS Edit. Springfield, Ill. 1950.
- 94 - STAUB (A.M.) et WESTPHAL (O.) - Etude chimique et biochimique de la spécificité immunologique des polysides bactériens.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, (1647-1684).
- 95 - MORGAN (W.T.J.) - Studies in immunochemistry; preparation and properties of specific polysaccharide from B. dysenteriae (Shiga).
Biochem. J., 1936, 30, (909-925).
- 96 - STAUB (A.M.), TINELLI (R.), LUDERITZ (O.) et WESTPHAL (O.) - Etude immunochimique sur les Salmonella - V. Rôle de quelques sucres et en particulier des 3-6 didesoxyhexoses, dans la spécificité des antigènes O du tableau de Kauffmann - white.
Ann. Inst. Pasteur, 1959, 96, (303-332).
- 97 - RINEHART (K.L.), WOO (P.W.K.) and ARGOUEDELIS (A.D.) - Chemistry of the neomycins. III - Structure of neobiosamine C.
J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, (6461-62).
- 98 - WESTPHAL (O.) -
Angew. Chem., 1952, 64, (314). (cité par DAVIES (92)).
- 99 - PON (G.) et STAUB (A.M.) - Etude chimique du polyside somatique typhique.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1952, 34, (1132-1144).
- 100 - WESTPHAL (O.), LUDERITZ (O.), FROMME (I.) and JOSEPH (N.) - New deoxy sugars, tyvelose and abequose as building stones of polysaccharide of Gram negative bacteria.
Angew. Chem., 1953, 65, (555-557).
- 101 - DAVIES (D.A.L.), STAUB (A.M.), FROMME (I.), LUDERITZ (O.) and WESTPHAL (O.) - Contribution of deoxymethylpentoses to the serological specificity of some bacterial polysaccharides, and the recognition of a new sugar, paratose.
Nature, 1958, 181, (822-825).
- 102 - LUDERITZ (O.), STAUB (A.M.), STIRM (S.) and WESTPHAL (O.) - Colitose a new monosaccharide which confers immuno specificity in endotoxins (lipopolysaccharides) of certain Gram negative bacteria.
Biochem. Z., 1958, 330, (193-197).

- I03 - WESTPHAL (O.) und LUDERITZ (O.) - 3.6 Didesoxy-hexosen-Chemie und Biologie.
Angew. Chem., 1960, 72, (881-891).
- I04 - WESTPHAL (O.) und LUDERITZ (O.) - Biological significance of the chemical fine structure of bacterial cell boundary surfaces.
Naturwissenschaften, 1963, 50, (413-426).
- I05 - SLEIN (M.W.) and SCHNELL (G.W.) - The polysaccharide of Shigella flexneri, type 3.
J. Biol. Chem., 1953, 203, (837-848).
- I06 - SLEIN (M.W.) and SCHNELL (G.W.) - An aldoheptose phosphate in a polysaccharide isolated from Shigella flexneri.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1953, 82, (734-738).
- I07 - WEIDEL (W.), KOCH (G.) und BOBOSCH (K.) - Über die Rezeptorsubstanz für Phagen T 5 - Extraktion und Reindarstellung aus E.coli B.
Z. Naturforsch., 1954, 9b, (573-579).
- I08 - FROMME (I.), LUDERITZ (O.) und WESTPHAL (O.) - Bacterial irritants - V. Identification of the sugars of a lipopolysaccharide pyrogen of Escherichia coli with the aid of paper chromatography and the sulfuric acid reaction of Dische.
Z. Naturforsch., 1954, 9b, (303-307).
- I09 - DAVIES (D.A.L.) - The specific polysaccharides of some Gram-negative bacteria.
Biochem. J., 1955, 59, (696-704).
- II0 - Mac LENNAN (A.P.) and DAVIES (D.A.L.) - Isolation of D-galacto-heptose from the specific polysaccharide of Chromobacterium violaceum (BN).
Biochem. J., 1956, 63, (31 p.).
- III - Mac LENNAN (A.P.) and DAVIES (D.A.L.) - The isolation of D-glycero-D-galacto heptose and other sugar components from specific polysaccharide of Chromobacterium violaceum (BN).
Biochem. J., 1957, 66, (562-567).
- II2 - DAVIES (D.A.L.) - Natural occurrence of a new aldoheptose sugar.
Nature, 1957, 180, (1129-1130).
- II3 - DAVIES (D.A.L.) - The smooth and rough somatic antigens of Pasteurella pseudotuberculosis.
J. Gen. Microbiol., 1958, 18, (118-128).
- II4 - CRUMPTON (M.J.), DAVIES (D.A.L.) and HUTCHINSON (A.M.) - The serological specificities of Pasteurella pseudotuberculosis somatic antigens.
J. Gen. Microbiol., 1958, 18, (129-139).

- II5 - Mac LENNAN (A.P.) and RONDLE (C.J.M.) - Pasteurella septica : the occurrence of type-specific polysaccharide containing aldoheptose sugars.
Nature, 1957, 180, (1045-1046).
- II6 - Mac LENNAN (A.P.) - Specific lipopolysaccharides of Haemophilus bronchisepticus, H. pertussis and H. parapertussis.
Biochem. J., 1957, 67, (3 p.).
- II7 - OSBORN (M.J.), ROSEN (S.M.), ROTHFIELD (L.) and HORECKER (B.L.) - Biosynthesis of bacterial lipopolysaccharide. I- Enzymatic incorporation of galactose in a mutant strain of Salmonella.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1962, 48, (1831-1834).
- II8 - QUINNEL (C.M.), KNIGHT (S.C.) and WILSON (P.W.) - The polysaccharide produced by Azotobacter indicum.
Can. J. Microbiol., 1957, 3, (277-288).
- II9 - CRUMPTON (M.J.) and DAVIES (D.A.L.) - The isolation of D-gucosamine from the specific polysaccharide of Chromobacterium violaceum. (NCTC 7917).
Biochem. J., 1958, 70, (729-736).
- I20 - SMITH (E.J.), LEATHERWOOD (J.M.) and WHEAT (R.W.) - Isolation of a new amino sugar from "Chromobacterium Violaceum".
J. Bact., 1962, 84, (1007-1010).
- I21 - STEVENS (C.L.), BUMBERGS (P.), DANIHAR (F.A.), WHEAT (R.W.), KUJOMOTO (A.) and ROLLINS (E.L.) - The identification and synthesis of the 4-aminosugar from Chromobacterium violaceum.
J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, (3061).
- I22 - FELIX (A.) - Properties of different Salmonella Vi antigens.
J. Hyg., 1952, 51, (515-539).
- I23 - WEBSTER (M.E.), LANDY (M.) and FREEMAN (M.E.) - Studies on Vi antigen; purification of Vi antigen from Escherichia coli 5396/38.
J. Immunol., 1952, 69, (135-142).
- I24 - CLARK (W.R.), Mc LAUGHLIN (J.) and WEBSTER (M.E.) - An aminohexuronic acid as the principal hydrolytic component of the vi antigen.
J. Biol. Chem., 1958, 230, (81-89).
- I25 - HEYNS (K.), KIESSLING (G.), LINDENBERG (W.), PAULSEN (H.) und WEBSTER (M.E.) - D-Galactosaminuron säure (2-amino-2-desoxy-D-galakturonsäure) als Baustein des Vi Antigens.
Chem. Ber., 1959, 92, (2435-2438).

- I26 - STAUB (A.M.) et RAYNAUD (M.) - Structure des antigènes O, R, H et Vi des Salmonella dans "The world problem of Salmonellosis". Van OYE édit., 1964, p.143.
- I27 - HEATH (E.C.) and GHALAMBOR (M.A.) - 2-keto-3-deoxy-octonate, a constituent of cell wall lipopolysaccharide. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1963, 10, (340-345).
- I28 - OSBORN (M.J.), ROSEN (S.M.), ROTHFIELD (L.), ZELEZNICK (L.D.) and HORECKER (B.L.) - Lipopolysaccharide of the Gram negative cell-wall. Science, 1964, 145, (783-789).
- I29 - OSBORN (M.J.) - The Gram negative cell wall I. Evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of Salmonella typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1963, 50, (499-506).
- I30 - STAUB (A.M.) - The role of the polysaccharide moiety in determining the specificity and immunological activity of the O-antigen complex of salmonellae. in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p.38-48.
- I31 - STAUB (A.M.) et TINELLI (R.) - Étude immunochimique sur les Salmonelles IV. Structure chimique de certains motifs antigéniques présents dans les "Antigènes" O 9 et I2 du tableau de White-Kauffmann. Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, 39, (65-83).
- I32 - ROBBINS (P.W.) and UCHIDA (T.) - The chemical basis of the phage conversion of O antigens in the E-group Salmonellae. Biochemistry, 1962, 1, (323-335).
- I33 - STAUB (A.M.), TINELLI (R.), WESTPHAL (O.) and LUDERITZ (O.) - Structures chimiques responsables de la spécificité de quelques antigènes O des Salmonelles. Résumés VII ème Congr. Intern. Microbiol. Stockholm, 1958, p. II5-II6.
- I34 - WESTPHAL (O.) - Récentes recherches sur la chimie et la biologie des endotoxines des bactéries à Gram négatif. Ann. Inst. Pasteur, 1960, 98, (789-813).
- I35 - KAUFFMANN (F.), LUDERITZ (O.), STIERLIN (H.) und WESTPHAL (O.) - Zur Immunochemie der O-antigene von Enterobacteriaceae. I - Analyse der Zuckerbausteine von Salmonella O-Antigenen. Zbl. Bakteriол. Parasitenk. Abt. I orig., 1960, 178, (442-458).
- I36 - KAUFFMANN (F.), BRAUN (O.H.), LUDERITZ (O.), STIERLIN (H.) und WESTPHAL (O.) - Zur Immunochemie der O-Antigen von Enterobacteriaceae. IV - Analyse der Zuckerbausteine von Escherichia - O-antigenen. Zbl. Bakteriол. Parasitenk, Abt. I orig., 1960, 180, (180).

- I37 - KAUFFMANN (F.), KRUEGER (L.), LUDERITZ (O.) und WESTPHAL (O.) - Zur Immunochemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae. VI. Vergleich der Zuckerbausteine von polysacchariden aus Salmonella-S- und R- Formen. Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde. Abt. I orig, 1961, 182, (57-66).
- I38 - STAUB (A.M.), TINELLI (R.) - Etude Immunochemique des facteurs O présents sur les polysides spécifiques de quelques Salmonella. Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, (1637-55).
- I39 - STOCKER (B.A.D.), STAUB (A.M.), TINELLI (R.) et KOPACKA (B.) - Etude immunochemique sur les Salmonella. VI - Etude de l'antigène I présent sur deux Salmonella des groupes B et E. Ann. Inst. Pasteur, 1960, 98, (505-523).
- I40 - UCHIDA (T.), ROBBINS (P.W.) and LURIA (S.E.) - Analysis of the serologie determinant group of the Salmonella E group O antigens. Biochemistry, 1963, 2, (663-668).
- I41 - WESTPHAL (O.) und LUDERITZ (O.) - Zur chemischen analyse von lipopolysacchariden gramnegativer bacterien : neue desoxyzucker sowie ein beitrage zur chemischen differenzierung einiger O - glatt und O - rauhe formen. Atti VI Congr. Intern. Microbiol, 1953, 2, (22-27).
- I42 - LEVIN (D.H.) and RACKER (E.) - Condensation of arabinose 5-phosphate and phosphorylenol pyruvate by 2-keto-3-deoxy-8-phosphooctonic acid synthetase. J. Biol. Chem., 1959, 234, (2532-2539).
- I43 - WESTPHAL (O.), BECKMAN (I.), HAMMERLING (U.), JANN (B.), JANN (K.) and LUDERITZ (O.) - Recent investigations on the polysaccharide component of enterobacterial endotoxins. (S and R forme). in "Bacterial endotoxins" LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p.I-I5.
- I44 - NIKAIDO (H.) - Studies on the biosynthesis of cell-wall polysaccharide in mutant strains of Salmonella, I. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1962, 48, (1337-41).
- I45 - NIKAIDO (H.) - Studies on the biosynthesis of cell-wall polysaccharide in mutant strains of Salmonella, II. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1962, 48, (1542-1543).
- I46 - NIKAIDO (H.) - Galactose - sensitive mutants of Salmonella. I Metabolism of galactose. Biochim. Biophys. Acta, 1961, 48, (460-469).
- I47 - FUKASAWA (T.) and NIKAIDO (H.) - Formation of "protoplasts" in mutant strains of Salmonella induced by galactose. Nature, 1959, 183, (1131-1132).

- I48 - FUKASAWA (T.) and NIKAIDO (H.) - Galactose-sensitive mutants of Salmonella.
Nature, 1959, 184, (1168-1169).
- I49 - FUKASAWA (T.) and NIKAIDO (H.) - Galactose-sensitive mutants of Salmonella. II - Bacteriolysis induced by galactose.
Biochim. Biophys. Acta, 1961, 48, (470-483).
- I50 - FUKASAWA (T.) and NIKAIDO (H.) - Galactose mutants of Salmonella typhimurium.
Genetics, 1961, 46, (1295-1303).
- I51 - NIKAIDO (H.) and JOKURA (K.) - Isolation of cytidine diphosphate 3,6 dideoxyhexoses from Salmonella.
Biochem. Biophys. Res. Com., 1961, 6, (304-309).
- I52 - NIKAIDO (H.) - Biosynthesis and structure of O-antigenic polysaccharide in Salmonella.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 67-71.
- I53 - OSBORN (M.J.), ROSEN (S.M.), ROTHFIELD (L.) and HORECKER (B.L.) - Galactose incorporation into cell-wall lipopolysaccharide in mutant strain of Salmonella typhimurium.
Science, 1962, 136, (328).
- I54 - ROSEN (S.M.) and HORECKER (B.L.) - Galactose incorporation into the lipopolysaccharide of a mutant strain of S. typhimurium.
Fed. Proc., 1963, 22, (465).
- I55 - ROTHFIELD (L.), FRAENKEL (D.) and OSBORN (M.J.) - Enzymatic incorporation into cell wall polysaccharide in Salmonella typhimurium.
Fed. Proc., 1963, 22, (465).
- I56 - FRAENKEL (D.), OSBORN (M.J.), HORECKER (B.L.) and SMITH (S.) - Metabolism and cell wall structure of a mutant of Salmonella typhimurium deficient in phosphoglucose isomerase.
Biochim. Biophys. Res. Comm., 1963, 11, (423-428).
- I57 - GROLLMAN (A.P.) and OSBORN (M.J.) - O-Phosphorylethanolamine : a component of lipopolysaccharide in certain Gram negative bacteria.
Biochemistry, 1964, 3, (1571-1574).
- I58 - SUTHERLAND (T.W.), LUDERITZ (O.) and WESTPHAL (O.) - Studies on the structure of lipopolysaccharides of Salmonella minnesota and Salmonella typhimurium R strains.
Biochem. J., 1965, 96, (439-448).

- I59 - RIBI (E.), ANACKER (R.L.), HASKINS (W.T.), LANDY (M.), MILNER (K.C.) and SMITH (R.) - Physico-chemical properties of haptenes and cell-wall extracts from Escherichia coli.
Bacteriol. Proc., 1964 b, p. 20.
- I60 - WESTPHAL (O.) - in "Bacterial Endotoxins" LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, discussion p. 89-90.
- I61 - EDSTROM (R.D.) and HEATH (E.C.) - Sugar nucleotide transferases in Escherichia coli lipopolysaccharide biosynthesis.
Fed. Proc., 1964, 23, (380).
- I62 - WEBSTER (M.E.), SAGIN (J.F.), LANDY (M.) and JOHNSON (A.G.) - Studies on the O antigen of Salmonella typhosa. I - Purification of the antigen.
J. Immunol., 1955, 74, (455-465).
- I63 - LANDY (M.), JOHNSON (A.G.), WEBSTER (M.E.) and SAGIN (J.F.) - Studies on the O antigen of Salmonella typhosa. II - Immunological properties of the purified antigen.
J. Immunol., 1955, 74, (466-478).
- I64 - RIBI (E.), HOYER (B.H.), MILNER (K.C.), PERRINE (T.D.), LARSON (C.L.) and GOODE (G.) - Physical and chemical analysis of endotoxin from Salmonella enteritidis.
J. Immunol., 1960, 84, (32-47).
- I65 - VINCENT (H.) - Sur la pluralité des toxines du Bacillus coli et sur les bases expérimentales de la sérothérapie anticolibacillaire.
C. R. Acad. Sc., 1925, 180, (1624-1626).
- I66 - BOIVIN (A.) - Sur l'existence de toxine thermolabile et neurotrope (exotoxine) dans les corps bactérien du bacille de Shiga.
C. R. Acad. Sci., 1937, 204, (1759-1761).
- I67 - BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.) - Recherches sur les toxines des bacilles dysentériques. Sur la nature et les propriétés biologiques des principes toxiques susceptibles de se rencontrer dans les filtrats des cultures sur bouillon du bacille de Shiga.
C. R. Soc. Biol., 1937, 124, (442-444).
- I68 - BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.) - Recherches sur les toxines des bacilles dysentériques. Sur l'existence d'un principe toxique thermolabile et neurotrope dans les corps bactériens du bacille de Shiga.
C. R. Soc. Biol., 1937, 126, (222-225).
- I69 - BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.) - Recherches sur les toxines des bacilles dysentériques. Sur l'identité entre la toxine thermolabile et neurotrope des corps bactériens du bacille de Shiga et l'exotoxine présente dans les filtrats des cultures sur bouillon de la même bactérie.
C. R. Soc. Biol., 1937, 126, (323-325).

- I70 - BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.) - Recherches sur les toxines du bacille dysentérique. Sur la signification des toxines produites par le bacille de Shiga et par le bacille de Flexner.
C. R. Soc. Biol., 1937, 126, (652-655).
- I71 - BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.) - Sur la nature et les propriétés biologiques des toxines produites par le bacille de Shiga et par le bacille Flexner.
C. R. Acad. Sci., 1937, 204, (302-304).
- I72 - BOIVIN (A.) - Les deux **toxines** du bacille de Shiga et leur place dans la classification générale des toxines bactériennes.
Rev. d'Immunol., 1940, 6, (86-115).
- I73 - DIGEON (M.) et RAYNAUD (M.) - Etudes sur la toxine R 2 du bacille typhique. VI - Action toxique expérimentale. A - Caractères généraux de l'intoxication.
Ann. Inst. Pasteur, 1957, 92, (642-651).
- I74 - GALLUT (J.) et GRABAR (P.) - Recherches immunochimiques sur le vibron cholérique. III - Mise en évidence de deux constituants toxiques de nature différente dans la toxine cholérique.
Ann. Inst. Pasteur, 1945, 71, (83-92).
- I75 - GRABAR (P.) et GALLUT (J.) - Recherches immunochimiques sur le vibron cholérique. IV - Essais de purification de la substance hypothermisante de la toxine cholérique.
Ann. Inst. Pasteur, 1945, 71, (321-326).
- I76 - FRETER (R.) - Two different toxic fractions extracted from Vibrio comma.
J. Infect. Dis., 1956, 99, (207-211).
- I77 - JENKIN (C.R.) and ROWLEY (D.) - Toxic proteins from Vibrio cholerae and water vibrios which are lethal for mice.
J. Gen. Microbiol., 1959, 21, (191-202).
- I78 - BOROFF (D.A.) - Study on toxins and antigens of Shigella dysenteriae; toxicity and antigenicity of whole organisms and various fractions of Shigella dysenteriae.
J. Bacteriol., 1949, 57, (617-632).
- I79 - BOROFF (D.A.) and MACRI (B.J.) - Study on toxins and antigens of Shigella dysenteriae; active protection of rabbits with whole organisms and fractions of Shigella dysenteriae.
J. Bacteriol., 1949, 58, (387-394).
- I80 - HEYNINGEN (W.E.Van) and GLADSTONE (G.P.) - The neurotoxin of Shigella shigae. I - Production, purification and properties of the toxin.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1953, 34, (202-216).

- I81 - MESROBEANU (I.), MESROBEANU (L.), GEORGESCO (M.), DRAGHICI (D.) et ALAMITA (E.) - Comm. V^o Congr. Intern. Biochim. Moscou, 1961, p.289. (cité par MESROBEANU et coll. (I84)).
- I82 - MESROBEANU (L.), MESROBEANU (I.) et MITRICA (N.) - Comm. V^o Congr. Intern. Biochim. Moscou, 1961, p. 289. (cité par MESROBEANU et coll.(I84)).
- I83 - MESROBEANU (L.), MESROBEANU (I.) et MITRICA (N.) - Les endotoxines thermolabiles (neurotoxines) des germes Gram négatif. I - Les neurotoxines "S" et "R" de Bacillus typhimurium. Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol., 1961, 20, (399-423).
- I84 - MESROBEANU (L.), MESROBEANU (I.) et MITRICA (N.) - Les endotoxines thermolabiles (neurotoxines) des germes Gram négatif. II - Les neurotoxines des bacilles dysentériques. Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1962, 21, (31-44).
- I85 - MESROBEANU (L.), MITRICA (N.) et MESROBEANU (I.) - Les endotoxines thermolabiles (neurotoxines) des germes Gram négatif. V - Les neurotoxines du colibacille. Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1962, 21, (704-717).
- I86 - IVANOVICS (G.) - Bacteriocins and bacteriocin-like substances. Bact. Rev., 1962, 26, (108-118).
- I87 - FREDERICQ (P.) - Colicines et autres bactériocines. Ergeb. Mikrobiol. Immunol. Exp. Therap. Berlin, 1963, 37, (114-161).
- I88 - REEVES (P.) - The bacteriocins. Bact. Rev., 1965, 29, (24-45).
- I89 - FREDERICQ (P.) - On the nature of colicinogenic factors : a review. J. Theor. Biol., 1963, 4, (159-165).
- I90 - GOEBEL (W.F.) and BARRY (G.T.) - Colicine K. II - The preparation and properties of a substance having colicine K activity. J. Exptl. Med., 1958, 107, (185-209).
- I91 - AMANO (T.), GOEBEL (W.F.) and MILLER-SMIDT (E.) - Colicine K. III - The immunological properties of a substance having colicine K activity. J. Exptl. Med., 1958, 108, (731-752).
- I92 - RUDE (E.) and GOEBEL (W.F.) - Colicine K. V - The somatic antigen of a non-colicinogenic variant of E. coli K 235. J. Exptl. Med., 1962, 116, (73-100).

- I93 - HOMMA (J.Y.) and SUZUKI (N.) - A simple protein with pyocine activity isolated from the cell wall of Pseudomonas aeruginosa and its close relation to endotoxin.
Japan J. Exptl. Med., 1961, 31, (209-213).
- I94 - HOMMA (J.Y.), SUZUKI (N.) and HORIE (K.) - Studies on the bacterial surface structure of Gram-negative bacteria and its biological active substances. II - Pyrogenic properties of the constituents dissociated from the fluid culture media, specially pertaining to the manifestations of pyrogenic of the high-molecular substances.
Japan, J. Bacteriol. 1961, 16, (827-833).
- I95 - HOMMA (J.Y.), SUZUKI (N.) and FUKUYAMA (S.) - Studies on the bacterial surface structure of Gram-negative bacteria and its biological active substances. IV - Pyocine activity of the endotoxin protein of Pseudomonas aeruginosa.
Japan J. Bacteriol., 1961, 17, (123-129).
- I96 - HOMMA (J.Y.), SUZUKI (N.) and ITO (F.) - The surface structure of Pseudomonas aeruginosa.
J. Immunol., 1963, 90, (819-828).
- I97 - HOMMA (J.Y.) and SUZUKI (N.) - Cell-wall protein A of Pseudomonas aeruginosa and its relation to original endotoxin protein.
J. Bacteriol., 1964, 87, (630-640).
- I98 - KOCH (G.) und WEIDEL (W.) - Über die Receptorsubstanz für den Phagen T. 5. IV - Mitteil : Eine einfache Methode zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren und ihre Anwendung für Vergleich zwischen Receptorsubstanz und mutativem Abwandlungsprodukt.
Z. Physiol. Chem., 1956, 303, (213-223).
- I99 - SALTON (M.R.J.) - Studies of the bacterial cell wall. VII - Monosaccharide constituents of the walls of Gram negative bacteria.
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, (364-371).
- 200 - SCHOCHER (A.J.), BAYLEY (S.T.) and WATSON (R.W.) - Composition of purified mucopeptide from the wall of Aerobacter cloacae.
Canad. J. Microbiol., 1962, 8, (89-98).
- 201 - MANDELSTAM (J.) - Preparation and properties of the mucopeptides of cell walls of Gram-negative bacteria.
Biochem. J., 1962, 84, (294-299).
- 202 - MARTIN (H.H.) and FRANK (H.) - Quantitative Bausteinanalyse der Stützmembran in der Zellwand von "Escherichia coli" B.
Z. Naturforsch., 1962, 17 b, (190-196).

- 203 - INGRAM (V.M.) and SALTON (M.R.J.) - The action of fluorodinitrobenzene on bacterial cell walls.
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 24, (9-19).
- 204 - SALTON (M.R.J.) - Studies of the bacterial cell wall. VIII - Reaction of walls with hydrazine and with fluorodinitrobenzene.
Biochim. Biophys. Acta, 1961, 52, (329-342).
- 205 - ASSELINEAU (J.) - Les lipides bactériens.
Hermann édit. Paris, 1962, 350 pages.
- 206 - KUROKAWA (M.), HOTTA (K.), YOSHIMURA (T.), MAKITA (M.) and HARA (I).
- Cephalin of Escherichia coli.
Bull. Chem. Soc. Japan, 1959, 32, (28-31).
- 207 - RIBI (E.), HASKINS (W.T.), LANDY (M.) and MILNER (K.C.) - Symposium on bacterial endotoxins. I - Relationship of chemical composition to biological activity.
Bact. Rev., 1961, 25, (427-436).
- 208 - DAVIES (D.A.L.), CRUMPTON (M.J.), Mac PHERSON (I.A.) and HUTCHINSON (A.M.)
- The adsorption of bacterial polysaccharides by erythrocytes.
Immunology, 1958, 2, (157-171).
- 209 - KASAI (N.), AOKI (Y.), WATANABE (T.), ODAKA (T.), YAMAMOTO (T.) -
Studies on the antitumor effect of the bacterial lipid component, lipid A. I - On some physicochemical properties and antitumor activity of lipid A fraction.
Japan J. Microbiol., 1961, 5, (347-366).
- 210 - TAUBER (H.) and GARSON (W.) - Isolation of lipopolysaccharides endotoxin.
J. Biol. Chem., 1959, 234, (1391-1393).
- 211 - MERGENHAGEN (S.E.), MARTIN (G.R.) and SCHIFFMANN (E.) - Studies on an endotoxin of a group C Neisseria meningitidis.
J. Immunol., 1963, 90, (312-317).
- 212 - ORMSBEE (R.A.) and LARSON (C.L.) - Studies on Bacterium tularensis antigens; chemical and physical characteristics of protective antigen preparations.
J. Immunol., 1955, 74, (359-370).
- 213 - MILES (A.A.) and PIRIE (N.W.) - The properties of antigenic preparation from Brucella melitensis. III - The biological properties of the antigen and the products of gentle hydrolysis.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1939, 20, (278-296).

- 214 - Mac LENNAN (A.P.) - Specific lipopolysaccharides of Bordetella.
Biochem. J., 1960, 74, (398-409).
- 215 - IKAWA (M.), KOEPFLI (J.B.), MUDD (S.G.) and NIEMANN (C.) - An agent from E. coli causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor. III - The component fattyacids of the phospholipide moiety.
J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, (1035-1038).
- 216 - NETER (E.), ANZAI (H.), GORZINSKI (E.A.), NOWOTNY (A.) and WESTPHAL (O.) - Effects of lipoid A component of Escherichia coli endotoxin on dermal reactivity of rabbits to epinephrine.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1960, 103, (783-786).
- 217 - TAKEDA (Y.), KASAI (N.), ARAKI (M.) und ODAKA (T.) - Die chemie des O Antigens seine toxität und antigenität.
Z. Physiol. Chem., 1957, 307, (49-61).
- 218 - DAVIES (D.A.L.), MORGAN (W.T.J.) and MOSIMAN (W.) - Studies in immunochemistry. I3 - Preparation and properties of the O somatic antigen of Shigella dysenteriae (Shiga).
Biochem. J., 1954, 56, (572-581).
- 219 - TAL (C.) and GOEBEL (W.F.) - On the nature of toxic component of somatic antigen of Shigella paradysenteriae type Z (Flexner).
J. Exptl. Med., 1950, 92, (25-34).
- 220 - JOHNSON (R.B.) - Immunogenic antigen of low tixicity derived from Shigella sonnei.
J. Immunol., 1955, 74, (286-292).
- 221 - BENDICH (A.) and CHARGAFF (E.) - Isolation and characterization of 2 antigenic fractions of Proteus OX-I9.
J. Biol. Chem., 1946, 166, (283-312).
- 222 - NOWOTNY (A.) - Relation of structure to function in bacterial O antigens. II - Fractionation of lipids present in Boivin-type endotoxis of Serratia marcescens.
J. Bacteriol., 1963, 85, (427-435).
- 223 - MERGENHAGEN (S.E.), SCHIFFMANN (E.), MARTIN (G.R.) and JENSEN (S.B.) - Stimulation of resistance to infection by lipoid derived from Neisseria meningitidis endotoxin.
J. Inf. Diseases, 1963, 113, (58).
- 224 - FOLKERS (K.) - Lipids
U.S. Patent applied for, 1963, N° 3089, 821.

- 225 - IKAWA (M.), KOEPFLI (J.B.), MUDD (S.G.) and NIEMANN (C.) - An agent from E.coli causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor. I - Isolation and properties.
J. Nat. Cancer Inst., 1952, 13, (157-166).
- 226 - IKAWA (M.), KOEPFLI (J.B.), MUDD (S.G.) and NIEMANN (C.) - An agent from E.coli causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor. IV - Some nitrogenous components of the phospholipide moiety.
J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, (3439-3442).
- 227 - WESTPHAL (O.), LUDERITZ (O.) and KEIDERLING (W.) - Über die Wirkungsweise bakterieller Reizstoffe - Beitrag zur biochemischen Analyse des Entzündungsvorgangs.
Zbl. Bakt., 1952, 158, (152-160).
- 228 - WESTPHAL (O.), LUDERITZ (O.), EICHENBERGER (E.) and NETER (E.) - Mucopolysaccharides of Gram-negative bacteria : newer chemical and biological aspects.
Ciba symp. on chemistry and biology of mucopolysaccharides
J. and A. Churchill, London, 1958, (187-199).
- 229 - WESTPHAL (O.), NOWOTNY (A.), LUDERITZ (O.), HURNI (H.), EICHENBERGER (E.) and SCHONHOLZER (G.) - Die Bedeutung der Lipoid-Komponente (Lipoid A) für die biologischen Wirkungen bakterieller Endotoxine. (Lipopolysaccharide).
Pharm. Acta. Helv., 1958, 33, (401-411).
- 230 - WESTPHAL (O.) - Verfahren zur Gewinnung von reinen Lipoid aus durch Spaltung von Lipopolysacchariden Gram negative Bakterien gewonnenem Rohlipoid.
WANDER FORSCHUNGSINSTITUT, A.G. m. B.H. Freiburg (Breisgau)-Zähringen
Deutsches Patentamt Auslegeschrift, 1960, (1073-150).
- 231 - NAGASAWA (M.) - Lipoid A from lipopolysaccharides.
Taisho Pharmaceutical Co., Ltd. - Japan. 16,897('63), Sept. 3. -
Appl. Mar. 26, 1962; 2 pp. - (Chem Abstr., 1964, 60, 2078 b).
- 232 - NOWOTNY (A.) - On the Chemistry of the lipid components. (Lipid A) of endotoxins.
Lecture, Conférence on biological effects of endotoxins in relation to immunity, Freiburg, Germany, 28 July 1959.
- 233 - KASAI (N.) and YAMANO (A.) - Studies on the lipids of endotoxins. Thin layer chromatography of lipid fractions.
Japan J. Exptl. Med., 1964, 34, (329-344).
- 234 - NOWOTNY (A.) - Chemical structure and location of firmly-bound lipids present in some Gram-negative bacterial endotoxins.
Fed. Proc., 1961, 20, (270).

- 235 - NOWOTNY (A.) - Chemical structure of a phosphomucolipide and its occurrence in some strains of Salmonella.
J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, (501).
- 236 - MORGAN (W.T.J.) - Artificial antigen with blood-group A specificity.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1943, 24, (41-49).
- 237 - MORGAN (W.T.J.) and WATKINS (W.N.) - Blood-group A antigen prepared from A hapten of human origin.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1944, 25, (221-228).
- 238 - LUDERITZ (O.), WESTPHAL (O.) and NETER (E.) - The affinity of the lipopolysaccharides of Gram negative bacteria for proteins and lipids.
Cong. Intern. Biochim. Résumés communs., 3 ème Cong., Brussels, 1955, p; 94.
- 239 - NETER (E.) - Bacterial hemagglutination and hemolysis.
Bact. Rev., 1956, 20, (166-188).
- 240 - LANDY (M.), TRAPANI (R.J.) and CLARK (W.R.) - Studies on the O antigen of Salmonella typhosa. III - Activity of the isolated antigen in the hemagglutination procedure.
Am. J. Hyg., 1955, 62, (54-65).

C H A P I T R E III

- 241 - HASKINS (W.T.), LANDY (M.), MILNER (K.C.) and RIBI (E.) - Biological properties of parent endotoxins and lipoïd fractions with a kinetic study of acid hydrolyzed endotoxin.
J. Exptl. Med., 1961, 114, (665-684).
- 242 - RIBI (E.), HASKINS (W.T.) LANDY (M.) and MILNER (K.C.) - Symposium on bacterial endotoxins. I - Relationship of chemical composition to biological activity.
Bact. Rev., 1961, 25, (427-436).
- 243 - LANDY (M.) - Bacterial endotoxins.
Tex. Rep. Biol. Med., 1962, 20, (I-II).
- 244 - WESTPHAL (O.), LUDERITZ (O.) and STAUB (A.M.) - Bacterial endotoxins.
J. Med. Pharm. Chem., 1961, 4, (497-504).

- 245 - HORNUS (G.J.P.) and GRABAR (P.) - Relations quantitatives entre l'antigène glucido-lipidique O et le haptène glucidique du bacille typhique et les immunosérums de lapin.
Ann. Inst. Pasteur, 1941, 66, (136-158).
- 246 - STAUB (A.M.) et COMBES (R.) - Essais de dosage des antigènes somatiques au sein de S.typhi; dosage de l'antigène O dans les microbes de la souche 0-90I.
Ann. Inst. Pasteur, 1951, 80, (21-39).
- 247 - GRABAR (P.) et OUDIN (J.) - Etude sur le polyside O du bacille typhique et préparation d'un sérum de lapin spécifique de ce polyside.
Ann. Inst. Pasteur, 1947, 73, (627-634).
- 248 - STAUB (A.M.) - Rôle des anticorps antipolyosidiques dans l'agglutination des bacilles typhiques.
Ann. Inst. Pasteur, 1954, 86, (618-635).
- 249 - JESAITIS (M.A.) and GOEBEL (W.F.) - Lysis of T4 phage by specific lipocarbohydrate of phase II Shigella sonnei.
J. Exptl. Med., 1955, 102, (733-752).
- 250 - WEIDEL (W.) - Bacterial viruses (with particular reference to adsorption/pénétration).
Ann. Rev. Microbiol., 1958, 12, (27-48).
- 251 - BOIVIN (A.) et DELAUNAY (A.) - Determinisme chimique des réactions cellulaires au sein des foyers d'infection bactérienne.
Exp. Ann. de Biochimie Médicale, Masson et Cie, Paris, 1947, 7, (31-65).
- 252 - WATSON (D.W.) and KIM (Y.B.) - Immunological aspects of pyrogenic tolérance.
in "Bacterial endotoxins" LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p.522-536.
- 253 - Mc CLOSKEY (W.T.), PRICE (C.W.), Van WINKLE (W.), WELCH (H.) and CALVERY (H.O.) - Results of first U.S.P. collaborative study of pyrogens.
J. Am. Pharm. Assoc., 1943, 32, (69).
- 254 - BEESON (P.B.) - Tolerance to bacterial pyrogens. I - Factors influencing its development.
J. Exptl. Med., 1947, 86, (29-38).
- 255 - KEENE (W.R.), SILBERMAN (H.R.) and LANDY (M.) - Observations on the pyrogenic response and its application to the bioassay of endotoxin.
J. Clin. Invest., 1961, 40, (295-301).

- 256 - WATSON (D.W.) and KIM (Y.B.) - Modification of host response to bacterial endotoxins. I - Specificity of pyrogenic tolerance and the role of hypersensitivity in pyrogenicity, lethality and skin reactivity. J. Exptl. Med., 1963, 118, (425-446).
- 257 - PETERSDORF (R.G.) and SCHULMAN (J.A.) - The role of tolerance in the action of bacterial endotoxins. in "Bacterial endotoxins" LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 482-499.
- 258 - GREISMAN (S.E.), WAGNER (H.N.), IIO (M.), HORNICK (R.B.), CAROZZA (F.A.) and WOODWARD (T.E.) - Mechanisms of endotoxin tolerance in man. in "Bacterial endotoxins" LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 567-574).
- 259 - FREEDMAN (H.H.) - Passive transfer of tolerance to pyrogenicity of bacterial endotoxin. J. Exptl. Med., 1960, 111, (453-463).
- 260 - FREEDMAN (H.H.) and SULTZER (B.M.) - Aspects of endotoxin tolerance : phagocytosis and specificity. in "Bacterial endotoxins" LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 537-545.
- 261 - BEESON (P.B.) - Tolerance to bacterial pyrogens. II - Role of the reticulo endothelial system. J. Exptl. Med., 1947, 86, (39-44).
- 262 - CHEDID (L.), PARANT (M.), BOYER (F.) and SKARNES (R.C.) - Non specific host response in tolerance to the lethal effect of endotoxins. in "Bacterial endotoxins" LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 500-516.
- 263 - RUTENBURG (S.H.), RUTENBURG (A.M.), SMITH (E.E.) and FINE (J.) - On the nature of tolerance to endotoxins. in "Bacterial endotoxins" LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press., 1964, p. 517-521).
- 264 - ATKINS (E.) and SNELL (E.S.) - A comparison of the biological properties of Gram negative bacterial endotoxin with leucocyte and tissue pyrogens. in "Bacterial endotoxins" LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 134-143.
- 265 - HAMMER (D.), GOEBEL (W.F.), WESTPHAL (O.), SIEVERS (K.) and LUDERITZ (O.) Behavior of body temperature and the white blood cell formation in horses after injection of bacterial lipopolysaccharides. Z. Naturforsch., 1958, 13 b, (561-565).

- 266 - GERERANDY (J.C.), CRANSTON (W.I.) and SNELL (E.S.) - Initial process in action of bacterial pyrogens in man.
Clin.Science, 1954, 13, (453-459).
- 267 - CRANSTON (W.I.), GOODALE (F.), SNELL (E.S.) and WENDT (F.) - Role of leucocytes in initial action of bacterial pyrogens in man.
Clin. Science, 1956, 15, (219-226).
- 268 - PETERSDORF (R.G.) and BENNET (I.L.) - Studies on the pathogenesis of fever. VI - The effect of heat on endogenous and exogenous pyrogen in the serum of dogs.
Bull. John Hopkins Hosp., 1956, 100, (197-208).
- 269 - PETERSDORF (R.G.) and BENNET (I.L.) - Studies on pathogenesis of fever VIII - Fever producing substance in the serum of dogs.
J. Exptl. Med., 1957, 106, (293-314).
- 270 - SNELL (E.S.), GOODALE (F.), WENDT (F.) and CRANSTON (W.I.) - Properties of human endogenous pyrogen.
Clin. Science, 1957, 16, (615-626).
- 271 - CONNOR (D.G.) and KASS (E.H.) - Effect of artificial fever in increasing susceptibility to bacterial endotoxin.
Nature, 1961, 190, (453).
- 272 - KASS (E.H.), ATWOOD (R.P.) and PORTER (P.) - Observations on the locus of lethal action of bacterial endotoxin.
in "Bacterial endotoxins" LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 596-601.
- 273 - NAKANO (M.) - Mutants of Salmonella with unusually low toxicity for mice.
Nature, 1962, 196, (118-119).
- 274 - NOLL (H.) and BRAUDE (A.I.) - Preparation of a chemically modified non toxic E.coli endotoxin of high immunogenic potency.
Fed. Proc., 1961, 20, (260).
- 275 - NOLL (H.) and BRAUDE (A.I.) - Preparation and biological properties of a chemically modified Escherichia coli endotoxin of high immunogenic potency and low toxicity.
J. Clin. Inv., 1961, 40, (1935-1951).
- 276 - FREEDMAN (H.H.) and SULTZER (B.M.) - Immunizing agents.
Belg. 617, 368, Nov. 8, 1962.
US Appl. May 8, 1961 and Apr. 10, 1962, 22 p.
Chem. Abstr., 1963, 58, 8862 f.

- 277 - CHENG (W.F.), KAO (N.C.), TS'AO (K.H.), CH'EN (C.J.) and HSIN (T.C.)
- Studies on detoxification of Salmonella typhi endotoxin. II - Studies
on Li Al H₄ - detoxified endotoxin.
Chim. Med. J., 1964, 83, (45-48).
- 278 - NOWOTNY (A.) - Chemical detoxification of bacterial endotoxins.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers
University Press, 1964, p. 29-37.
- 279 - NOWOTNY (A.) - Endotoxoid preparations.
Nature, 1963, 197, (721-722).
- 280 - JOHNSON (A.G.) and NOWOTNY (A.) - Relationship of structure to function
in bacterial O antigen. III - Biological properties of endotoxoids.
J. Bacteriol., 1964, 87, (809-814).
- 281 - HOWARD (J.G.), ROWLEY (D.) and WARDLAW (A.C.) - Investigations on the
mechanism of stimulation of non specific immunity by bacterial lipopo-
lysaccharides.
Immunology, 1958, I, (181-203).
- 282 - FREEDMAN (H.H.), SULTZER (B.M.) and KLEINBERG (W.) - Detoxification
of bacterial endotoxin with retention of ability to stimulate non
specific resistance to infection.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1961, 107, (819-821).
- 283 - FREEDMAN (H.H.) and SULTZER (B.M.) - Dissociation of the biological
properties of bacterial endotoxin by chemical modification of the
molecule.
J. Exptl. Med., 1962, 116, (929-942).
- 284 - FINE (J.) - Some observations on the mechanism of action of bacterial
endotoxin.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers
University Press, 1964, p.(588-595).
- 285 - WEISSMANN (G.) and THOMAS (L.) - On a mechanism of tissue damage by
bacterial endotoxins.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers
University Press, 1964, p. 602-609.
- 286 - JANOFF (A.) and KALEY (G.) - Studies on lysozomes in tolerance, shock
and local injury induced by endotoxin.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers
University Press, 1964, p. 631-647.
- 287 - WOODS (M.), LANDY (M.), WHITEBY (J.L.) and BURK (D.) - Symposium on
bacterial endotoxins. III - Metabolic effects of endotoxins on
mammalian cells.
Bact. Rev., 1961, 25, (447-456).

- 288 - WOODS (M.), LANDY (M.), BURK (D.) and HOWARD (T.) - Effects of endotoxin on cellular metabolism.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 160-181.
- 289 - SCHAEGLER (R.W.) and DUBOS (R.J.)- Relationship of intestinal flora to resistance.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p.(390-396).
- 290 - SUTER (E.) - Hyperreactivity to endotoxin in infection.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 435-447.
- 291 - MUNOZ (J.) - Hypersensitivity reactions induced in mice treated with Bordetella pertussis.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 460-473.
- 292 - SCHAEGLER (R.W.) and DUBOS (R.J.) - The susceptibility of mice to bacterial endotoxins.
J. Exptl. Med., 1961, 113, (559-570).
- 293 - STINEBRING (W.R.), AXELROD (A.E.) and TRAKATELLIS (A.C.) - Cellular and systemic reactivity to endotoxin and the relationship to tuberculin (PPD) hypersensitivity.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 455-459.
- 294 - SUTER (E.) - Hypereactivity to endotoxin in infection.
Trans N.Y. Acad. Sci., 1962, 24, (281-290).
- 295 - SUTER (E.), ULLMAN (G.E.) and HOFFMAN (R.G.) - Sensitivity of mice to endotoxin after vaccination with B C G.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1958, 99, (167-169).
- 296 - SKARNES (R.C.) and CHEDID (L.C.) - Biological degradation and inactivation of endotoxin (chromate labeled).
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 575-587.
- 297 - BRAUDE (A.I.) - Absorption, distribution and elimination of endotoxins and their derivatives.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 98-109.
- 298 - BRANDIS (H.) - Über die Promunität (Depressionsimmunität).
Ergebn, Hyg. Bakt., 1954, 28, (141-202).

- 299 - SHILO (M.) - Resistance - increasing activity of bacterial lipopolysaccharides and their subfractions towards levan-enhanced infections. Brit. J. Exptl. Pathol., 1962, 43, (153-165).
- 300 - SHILO (M.) - Monospecific resistance to infections. Ann. Rev. Microbiol., 1959, 13, (255-278).
- 301 - WHITBY (J.L.), MICHAEL (J.G.), WOODS (M.W.) and LANDY (M.) - Possible mechanism whereby endotoxins evoke increased non specific resistance to infection. Bact. Rev., 1961, 25, (437-446).
- 302 - ROWLEY (D.) - Antibacterial systems of serum in relation to non specific immunity to infection. Bact. Rev., 1960, 24, (106-114).
- 303 - ROWLEY (D.) - Endotoxin induced changes in susceptibility to infections. in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964 p. 359-372.
- 304 - FIELD (T.E.), HOWARD (J.G.), and WHITBY (J.L.) - Studies on rapid production of non specific type of immunity to Salmonella typhi infection in mice. J. Roy. Army Med. Corps, 1955, 101, (324-334).
- 305 - ROWLEY (D.) - Stimulation of natural immunity to Escherichia coli infections. Observations in mice. Lancet, 1955, 268, (232-234).
- 306 - ROWLEY (D.) - Rapidly induced changes in the level of non specific immunity in laboratory animals. Brit. J. Exptl. Pathol., 1956, 37, (223-234).
- 307 - LANDY (M.) and PILLEMER (L.) - Increased resistance to infection and accompanying alteration in properdin levels following administration of bacterial lipopolysaccharides. J. Exptl. Med., 1956, 104, (383-409).
- 308 - DUBOS (R.J.) and SCHAEGLER (R.W.) - Reversible changes in the susceptibility of mice to bacterial infections. I - Changes brought about by injection of pertussis vaccine or of bacterial endotoxins. J. Exptl. Med., 1956, 104, (53-65).
- 309 - DUBOS (R.J.), SCHAEGLER (R.W.) and BOEHME (D.) - Resistance to Gram - positive and acid fast bacteria induced by Pertussis vaccine and by lipopolysaccharides. Fed. Proc., 1957, 16, (1879 S).

- 3I0 - HURNI (H.) - Infektionresistenz bei Mäusen nach Vorbehandlung mit Lipopolysacchariden.
Trans. VI ème Congr. Europ. Soc. Haematol. Copenhagen, 1957, (933-938).
- 3I1 - FISCHER (J.) - On modification of the bactericidal properties of the serum - A contribution to the problem of non specific resistance.
Schweiz. Z. Allg. Pathol., 1959, 22, (827-843).
- 3I2 - KISER (J.S.), LINDH (H.) and de MELLO (G.C.) - The effect of various substances on resistance to experimental infections.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1956, 66, (312-328).
- 3I3 - SHILO (M.) and WOLMAN (B.) - Activities of bacterial levans and of lipopolysaccharides in the processes of inflammation and infection.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1958, 39, (652-660).
- 3I4 - GLEDHILL (A.W.) - Influence of endotoxin upon the pathogenesis of viral infections.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 410-421.
- 3I5 - HOWARD (J.G.), ROWLEY (D.) and WARDLAW (A.C.) - Stimulation of non specific immunity by the lipid A component of bacterial lipopolysaccharide.
Nature, 1957, 179, (314-315).
- 3I6 - WESTPHAL (O.) - Zur chemie und Wirkungsweise pyrogener Reizstoffe.
Acta Neuroveget, Vienne, 1955, II, (126-129).
- 3I7 - RIBBLE (J.C.) - Increase of plasma lysozyme activity following injections of typhoid vaccine.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1961, 107, (597-600).
- 3I8 - COLOBERT (L.) - Lysozyme et autarcèse.
Path. Biol., 1960, 8, (1023-1038).
- 3I9 - ROWLEY (D.) - Some factors affecting the resistance of animals to bacterial infection.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1956, 66, (304-311).
- 320 - THORBECKE (G.J.), OLD (L.J.), BENACERAF (B.) and CLARKE (D.A.) - A histochemical study of acid and alkaline phosphatase in mouse livers during various conditions modifying activity of the reticulo-endothelial system.
J. Histochem. Cytochem., 1961, 9, (392-399).
- 321 - AUZINS (I.) - Communications personnelle rapportée par ROWLEY (303).

- 322 - ROWLEY (D.) - The role of opsonins in non specific immunity.
J. Exptl. Med., 1960, III, (137-144).
- 323 - HEGEMANN (F.) - Zur Bedeutung des Blutserums für die Entstehung und das Unwirksamwerden bakterieller Reizstoffe beim Menschen. II - Die neutralisierende Wirkung des menschlichen Serums auf das Endotoxin von Colibakterien.
Z. Naturforsch., 1954, 2, (213-225).
- 324 - WARDLAW (A.C.) and PILLEMER (L.) - Properdin system and immunity; bactericid activity of properdin system;
J. Exptl. Med., 1956, 103, (553-575).
- 325 - WEDGWOOD (R.J.) - Résumés VII ème Congr. Intern. Microbiol. Stockholm, 1958, 190. (cité par COLOBERT et KIRN (327)).
- 326 - COLOBERT (L.) et KIRN (A.) - Un nouveau facteur lytique du sérum sanguin humain normal : l'obsistine.
C. R. Soc. Biol., 1960, 154, -600-602).
- 327 - COLOBERT (L.) et KIRN (A.) - Les propriétés lytiques du sérum I. Individualisation d'un facteur du sérum humain normal : l'obsistine.
Ann. Inst. Pasteur, 1960, 99, (69-91).
- 328 - HALPERN (B.N.), BENACERRAF (B.) and BIOZZI (G.) - Quantitative study of granuloplectic activity of reticulo-endothelial system; effect of ingredients present in India ink and of substances affecting blood clotting in vivo on fate of carbon particles administered intravenously in rats, mice and rabbits.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1953, 34, (426-440).
- 329 - BIOZZI (G.), BENACERRAF (B.) and HALPERN (B.N.) - Effect of Salmonella typhi and its endotoxin on phagocytic activity of reticulo-endothelial system in mice.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1955, 36, (226-235).
- 330 - KELLY (L.S.), BROWN (B.A.) and DOBSON (E.L.) - Cell division and phagocytic activity in liver reticulo-endothelial cells.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1962, 110, (555-559).
- 331 - JENKIN (C.R.) and ROWLEY (D.) - The role of opsonins in the clearance of living and inert particles by cells of the reticulo-endothelial system.
J. Exptl. Med., 1961, 114, (363-374).
- 332 - MICHAEL (J.G.), WHITBY (J.L.) and LANDY (M.) - Increase in specific bacterial antibodies after administration of endotoxin.
Nature, 1961, 191, (296-297).

- 333 - MANWARING (W.H.) and COE (H.C.) - Endothelial opsonins.
J. Immunol., 1916, I, (401-408).
- 334 - HOWARD (J.G.) and WARDLAW (A.C.) - The opsonic effect of normal serum on the uptake of bacteria by the reticulo-endothelial system.
Immunology, 1958, I, (338-352).
- 335 - FUKUI (G.M.) - Some factors affecting endotoxin induced non specific resistance.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 373-381.
- 336 - NAKANO (M.), SAITO (K.), OKITSU (F.) and USHIBA (D.) - On the significance of endotoxins in experimental typhoid. II - On the infection enhancing effect of endotoxin.
Japan, J. Bacteriol., 1962, 17, (402-407).
- 337 - STUART (A.E.) et COOPER (G.N.) - Susceptibility of mice to bacterial endotoxin after modification of reticuloendothelial function by simple lipids.
J. Pathol. Bacteriol., 1962, 83, (245-254).
- 338 - HELLER (J.H.), RANSOM (J.P.) and PASTERNAK (V.Z.) - New advances in the stimulation of the R.E.S. dans "Rôle du système reticulo - endothelial dans l'immunité antibactérienne et antitumorale".
Editions du CNRS, 1963, p. 89-105.
- 339 - STUART (A.E.) - Structural and functional effects of lipids on the reticulo endothelial system dans "Rôle du système réticulo-endothelial dans l'immunité antibactérienne et antitumorale".
Editions du CNRS, 1963, p. 129-142.
- 340 - SHILO (M.) - Use of the levanised animal in the study of lipopolysaccharide induced resistance.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 382-389.
- 341 - RAMON (G.) et ZOELLER (C.) - Les "vaccins associés" par union d'une anatoxine et d'un vaccin microbien (TAB) ou par mélange d'anatoxines.
C.R. Soc. Biol. 1936, 94, (106-109).
- 342 - BORDET (J.) - A propos du vaccin antioquelucheux.
Brux. Med., 1936, 16, (503-505).
- 343 - MACLEAN (I.H.) and HOLT (L.B.) - Combined immunisation with tetanus toxoid and T.A.B.
Lancet, 1940, 239, (581-583).

- 344 - GREENBERG (L.) and FLEMING (D.S.) - Immunizing efficiency of diphtheria toxoid when combined with various antigens.
Canad. J. Public Health, 1948, 39, (502-506).
- 345 - BARNES (J.M.) et HOLT (L.B.) - Quantitative studies in diphtheria prophylaxis - Antigenic interactions; simultaneous inoculations.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1955, 36, (415-424).
- 346 - JOHNSON (A.G.); GAINES (M.) and LANDY (M.) - Studies on the O antigen of Salmonella typhosa. V - Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide.
J. Exptl. Med., 1956, 103, (225-246).
- 347 - CONDIE (R.M.), ZAK (S.) and GOOD (R.A.) - Effect of meningococcal endotoxin on the immune response.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1955, 90, (355-360).
- 348 - LANDY (M.) and JOHNSON (A.G.) - Studies on the O antigen of Salmonella typhosa. IV - Endotoxic properties of the purified antigen.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1955, 90, (57-62).
- 349 - STUART (E.G.) and WINDEL (W.F.)
Fed. Proc., 1951, 10, (133). (cité par STONE (356)).
- 350 - NICHOLAS (P.S.) and BUBEL (H.C.)
Bact. Proc., 1952, p. 74. (cité par STONE (356)).
- 351 - ROWLEY (D.)
Communication rapportée par WESTPHAL (134).
- 352 - HAMMER (D.), LUDERITZ (O.), NOWOTNY (A.) and WESTPHAL (O.)
Endotoxin Conference, Freiburg (All.) 28-31 Juillet 1959.
(cité par WESTPHAL (134)).
- 353 - FARTHING (J.R.) - The role of Bordetella pertussis as an adjuvant to antibody production.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1961, 42, (614-622).
- 354 - FARTHING (J.R.) and HOLT (L.B.) - Experiments designed to determine the mechanism of the adjuvant activity of Gram negative organisms upon antibody production.
J. Hyg., 1962, 60, (411-426).
- 355 - CONDIE (R.M.) and GOOD (R.A.) - Inhibition of immunological enhancement by endotoxin in refractory rabbit. Immunochemical study.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1956, 91, (414-418).
- 356 - STONE (S.H.) - Mécanismes de l'exaltation de l'antigénicité par les adjuvants.
in HALPERN (B.) "L'antigénicité" Editions Médicales Flammarion 1963, p. 83-95.

- 357 - JOHNSON (A.G.) - Adjuvant action of bacterial endotoxins on the primary antibody response.
in "Bacterial endotoxins", LANDY (M.) and BRAUN (W.) edit., Rutgers University Press, 1964, p. 252-262.
- 358 - FREUND (J.) McDERMOTT (K.) - Sensitization to horse serum by means of adjuvants.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1942, 49, (548-553).
- 359 - FREUND (J.) - The mode of action of immunologic adjuvants.
Adv. Tuberc. Research, 1956, 7, (130-148).
- 360 - RAFFEL (S.), ARNAUD (L.E.), DUKES (C.D.) et HUANG (J.S.) - Role of "wax" of tubercle bacillus in establishing delayed hypersensitivity: hypersensitivity to protein antigen egg albumin.
J. Exptl. Med., 1949, 90, (53-72).
- 361 - WHITE (R.G.), COONS (A.H.), and CONOLLY (J.M.) - Studies on antibody production; role of wax fraction of Mycobacterium tuberculosis in adjuvant emulsions on production of antibody to egg albumin.
J. Exptl. Med., 1955, 102, (83-104).
- 362 - WHITE (R.G.), BERNSTOCK (L.), JOHNS (R.G.S.) and LEDERER (E.) - The influence of components of "M.tuberculosis" and other mycobacteria upon antibody production to ovalbumin.
Immunology, 1958, 1, (54-56).
- 363 - WHITE (R.G.), JOLLES (P.), SAMOUR (D.) and LEDERER (E.) - Correlation of adjuvant activity in chemical structure of wax D fractions of mycobacteria.
Immunology, 1964, 7, (158-171).
- 364 - COLEY (W.B.) - Treatment of inoperable malignant tumors with the toxin of erysipela and the bacillus prodigiosus.
Tr. Am. S.A., 1894, 12, (183-212).
- 365 - GRATIA (A.) et LINZ (R.) - Le phénomène de Shwartzman dans le sarcome du cobaye.
C. R. Soc. Biol., 1931, 108, (427-428).
- 366 - SHWARTZMAN (G.) and MICHAILOVSKY (N.) - Phenomenon of local skin reactivity to bacterial filtrates in the treatment of mouse sarcome 180.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1932, 29, (737-741).
- 367 - SHEAR (M.J.) and ANDERVONT (H.B.) - Chemical treatment of tumors.
III - Separation of hemorrhage - producing fraction of B. coli filtrate.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1936, 34, (323-325).

- 368 - SHEAR (M.J.) - Chemical treatment of tumors. IV - Properties of hemorrhage producing fraction of B.coli filtrate. Proc. Soc. Exptl. Med., 1936, 34, (325-326).
- 369 - SHEAR (M.J.) and TURNER (F.C.) - Chemical treatment of tumors. V - Isolation of the hemorrhage - producing fraction from Serratia marcescens (Bacillus prodigiosus) culture filtrate. J. Nat. Cancer Inst., 1944, 4, (81-97).
- 370 - RATHGEB (P.) and SYLVEN (B.) - Fractionation studies on the tumor necrotizing agent from Serratia marcescens (Shear's polysaccharide). J. Nat. Cancer Inst., 1954, 14, (1099-1108).
- 371 - RATHGEB (P.) and SYLVEN (B.) - Chemical studies on the tumor-necrotizing agent from Serratia marcescens (Shear's polysaccharide). J. Nat. Cancer Inst., 1954, 14, (1109-1117).
- 372 - FOGG (L.C.) - Effect of certain bacterial products upon the growth of mouse tumor. Pub. Health Rep., 1936, 51, (56-64).
- 373 - GARNER (R.E.), BAILEY (G.H.) and HYDE (R.R.) - Hemorrhagic activity of toxic carbohydrate complexes from bacteria in a transplantable rat tumor. Am. J. Hyg., (Sect.B.) 1939, 29, (1-14).
- 374 - SHAPIRO (C.J.) - The effect of a toxic carbohydrate complex from S.enteritidis on transplantable rat tumors in tissue culture. Am. J. Hyg., (Sect.B.) 1940, 31, (114-126).
- 375 - ZAHL (P.A.), HUTNER (S.H.), SPITZ (S.), SUGIURA (K.) and COOPER (F.S.) - The action of bacterial toxins on tumors. I - Relationship of the tumor hemorrhagic agent to the endotoxin antigen of Gram negative bacteria. Am. J. Hyg., 1942, 36, (224-242).
- 376 - WALKER (E.L.) and HANDMAN (M.S.) - Biological reactions of malignant neoplasms. I - The reaction to bacterial fractions. J. Immunol., 1939, 37, (507-524).
- 377 - ZAHL (P.A.) - Action of bacterial toxins on tumors. VIII - Factors in their use for cancer therapy. J. Natl. Cancer Inst., 1950, 11, (279-288).
- 378 - MOSE (J.R.) - Bakterien und maligne Tumoren. Med. Klin., 1964, 59, (1189-1192).
- 379 - NETER (E.), MIHICH (E.) and WESTPHAL (O.) - Necrotizing effect of the lipid A component of endotoxin on mouse sarcoma 180. Fed. Proc., 1961, 20, (262).

- 380 - MIHICH (E.), WESTPHAL (O.), LUDERITZ (O.) and NETER (E.) - The tumor necrotizing effect of lipoid A component of Escherichia coli. Endotoxin. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1961, 107, (816-819).
- 381 - SUGIURA (K.) - Effect of various compounds on Ehrlich ascites carcinoma. Cancer Res., 1953, 13, (431-441).
- 382 - KLARNER (P.) - Regressionen des Yoshida-Sarkoms nach einmaliger Injektion eines lipopolysaccharids an E.coli. Z. Krebsforsch., 1958, 62, (291-296).
- 383 - BRADNER (W.T.), CLARKE (D.A.) and STOCK (C.C.) - Stimulation of host defense against experimental cancer. I - Zymosan and sarcoma I80 in mice. Cancer Res., 1958, 18, (347-351).
- 384 - MANILLA (G.T.), NICHOLLS (P.S.) and Mc CARTHY (C.G.) - Influence of bacterial pyrogen on transplantable tumors. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1960, 105, (387-390).
- 385 - NAUTS (H.C.), FOWLER (G.A.) and BOGATKO (F.H.) Review of influence of bacterial infection and of bacterial product (Coley's toxins) on malignant tumors in man critical analysis of 30 inoperable cases treated by Coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination selected for special study. Acta Med. Scand., 1953, 145, (I-103).
- 386 - PUTNAM (R.C.), POMEROY (T.C.), DONNELLY (A.J.), NISHIMURA (E.T.), BOWMAN (H.S.) and REIMAN (S.P.). Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 1957, 2, (240). cité par KASAI (209).
- 387 - PRIGAL (S.J.) - Development in mice of prolonged non specific resistance to sarcoma implant and staphylococcus infection following repository injection of lipopolysaccharide. Nature, 1961, 191, (1111-1112).
- 388 - LEONARDI (A.) - Attività citolitica e citostatica della necrosamina sintetica (4,5-diaminooctacosano) su due ceppi di cellule tumorali umane coltivate "in vitro". Giorn. It. Chemioter., 1958, 5, (291-295).
- 389 - NETER (E.), ANZAI (H.) and GORZYNSKI (E.A.) - The effects of staphylococcal extract and of viable staphylococci on dermal reactivity of the rabbit to epinephrine. J. Infect. Dis., 1960, 107, (332-340).
- 390 - MIHICH (E.) and NETER (E.) - Necrotizing effects of Staphylococcus aureus extract on mouse sarcoma I80. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1961, 106, (97-101).

- 391 - HIGGINBOTHAM (R.D.) and BASS (J.A.).
Bact. Proc., 1961, p. 109 cité par MIHICH et NETER (390).
- 392 - FREIMAN (V.B.)
Vop. Onkol., 1952, p. 5 cité par MOSE (378).
- 393 - WEISS (D.W.), BONHAG (R.S.) and DEOME (K.B.) - Protective activity of fractions of tubercle bacilli against isologous tumors in mice. Nature, 1961, 190, (889-891).
- 394 - VILKAS (E.) et LEDERER (E.) - Sur la structure du phosphatidyl-inositol dimannoside de Mycobacterium tuberculosis. Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, (1013-1022).
- 395 - BALLOU (C.E.), VILKAS (E.) and LEDERER (E.) - Structural studies on the myoinositol phospholipids of Mycobacterium tuberculosis strain BCG. J. Biol. Chem., 1963, 238, (69-76).
- 396 - ANDERVONT (H.B.) and SHINKIN (M.B.) - The effect of ascorbic acid upon hemorrhage produced by bacterial filtrate in transplanted tumors. Am. J. Cancer, 1939, 36, (451-459).
- 397 - APITZ (K.) - Über Blutungsreaktionen am Impfcarcinom der Maus. Z. Krebsforsch., 1933, 40, (50-70).
- 398 - SHEAR (M.J.) - Studies on the chemical treatment of tumors. II - The effect of disturbances in fluid exchange on transplanted mouse tumors. Am. J. Cancer, 1935, 25, (66-88).
- 399 - SHWARTZMAN (G.) - Phenomenon of local tissue reactivity and its immunological and clinical significance. P.E. HOERBER Inc., New-York, 1937, 461.
- 400 - LEWISOHN (R.), LEUCHTENBERGER (R.) and LASZLO (D.) - Spleen extract in the treatment of transplanted and spontaneous malignant tumors in mice. Surg. Gynec. and Obst., 1940, 71, (274-285).
- 401 - GERBER (I.E.) and BERNHEIM (A.Z.) - Morphologic study of the reactivity of mouse sarcoma 180 to bacterial filtrates. Arch. Pathol., 1938, 26, (971-983).

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE I

- 402 - LEA (CH.), RHODES (D.N.) and STOLL (R.D.) - Phospholipids - 3. On the chromatographic separation of glycerophospholipids. Biochem. J., 1955, 60, (353-363).
- 403 - PHILLIPS (G.B.) - The isolation and quantitation of the principle phospholipid components of human serum using chromatography on silic acid. Biochim. Biophys. Acta, 1958, 29, (594-602).
- 404 - CREACH (O.), MINAIRE (Y.) ISSARTEL (G.), GELIS (C.) BOULAYE (J.) et COLOBERT (L.) - Les lipides de la paroi ectoplasmique d'Eberthella typhi. II - Les constituants phospholipidiques de l'endotoxine. (à paraître)

CHAPITRE II

- 405 - MICHON (J.) et BOURRILLON (R.) - Etude cinétique de la libération des composés glucidiques à partir des glycoprotéines. Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41 (277-282).
- 406 - MONTREUIL (J.) et SCHEPPLER (N.) - Chromatographie quantitative des oses constituants des glycoprotéides. Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, (13-28).
- 407 - SOMOGYI (M.) - Notes on sugar determination. J. Biol. Chem., 1952, 195, (19-23).
- 408 - STAUB (A.M.) in LOISELEUR (J.) - Technique de laboratoire, Masson édit., Paris 1954, Tome I p. 793-794.

- 409 - DREYWOOD (R.) - Qualitative test for carbohydrate material.
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 1946, 18, (499).
- 410 - SCOTT (T.A.) and MELVIN (E.H.) - Determination of dextran with anthrone.
Anal. Chem., 1953, 28, (1656-1661).
- 411 - DIRHEIMER (G.) - Isolement et analyse d'un substrat soluble du lysozyme à partir de Micrococcus lysodeikticus et contribution à l'étude de l'action du lysozyme sur ce substrat.
Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Strasbourg, 1961, N° 17.
- 412 - BELCHER (R.), NUTTEN (A.J.) and SAMBROOK (C.M.) - Determination of glucosamine.
Analyst, 1954, 79, (201-208).
- 413 - ELSON (L.A.) and MORGAN (W.T.J.) - A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine.
Biochem. J., 1933, 27, (1824-1828).
- 414 - KEMBLE (A.R.) and MAC PHERSON (H.T.) - Determination of monocarboxylic acids by quantitative paper chromatography.
J. Biol. Chem., 1954, 56, (548-555).
- 415 - COHEN (P.P.) - Transamination with purified enzyme preparations (transaminase).
J. Biol. Chem., 1940, 136, (565-584).
- 416 - COLOBERT (L.) - Etude d'une protéinase de la bactérie aérobie Sarcina flava, variété P. beumeri.
Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles, Paris 1955, N° 3728.
- 417 - DURON (O.S.) and NOWOTNY (A.) - Microdetermination of long chain carboxylic acids by transesterification with boron trifluoride.
Anal. Chem., 1963, 35, (370-372).
- 418 - HASKINS (W.T.) - Spectrophotometric determination of fatty acid amides in lipids.
Anal. Chem., 1961, 33, (1145-1146).
- 419 - SNYDER (F.) and STEPHENS (N.) - A simplified spectrophotometric determination of ester groups in lipids.
Biochim. Biophys. Acta, 1959, 34, (244-245).
- 420 - TAUBER (H.) - Fatty acid ester groups in lipopolysaccharide endotoxins.
Fed. Proc., 1960, 19, (245).
- 421 - FISKE (C.H.) and SUBBAROW (Y.) - The colorimetric determination of phosphorus.
J. Biol. Chem., 1925, 66, (375-400).

- 422 - FAURE (M.)
in LOISELEUR (J.) Techniques de laboratoire, Masson édit.,
Paris 1954, tome I p. 748-749.
- 423 - BOULANGER (P.), BISERTE (G.) et COURTOT (F.) - Chromatographie sur
papier des acides aminés et polypeptides des liquides biologiques.
III - Amino-acide et peptides urinaires.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1952, 34, (366-379).
- 424 - BOAS (N.F.) - Method for the determination of hexosamines in tissues.
J. Biol. Chem., 1953, 204, (553-563).
- 425 - HOARE (D.S.) and WORK (E.) - The stereoisomers of α - ϵ diaminopimelic
acid : their distribution in nature and behaviour towards certain
enzyme preparations.
Biochem. J., 1955, 61, (562-568).
- 426 - BLASS (J.) - Technique rapide et sensible de recherche de l'acide
diamino-pimelique.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, (1003-1005).
- 427 - BOURRILLON (R.) et MICHON (R.) - Résolution et détermination quantitati-
ve par chromatographie sur papier des glucides liés aux protéines.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, (267-276).
- 428 - PARTRIDGE (S.M.) and WESTALL (R.G.) - Filter-paper partition chromato-
graphy of sugars. I - Général description and application to the qualitati-
ve analysis of sugars in apple juice , egg white and fetal blood of sheep.
Biochem. J., 1948, 42, (238-250).
- 429 - GLEGG (R.E.) and EIDINGER (D.) - Hydrolysis of polysaccharide by a cation
exchange resin and identification of monosaccharide components by paper
chromatography.
Anal. Chem., 1954, 26, (1365-1367).
- 430 - PARTRIDGE (S.M.) - Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for
chromatography of sugars.
Nature, 1949, 164, (443).
- 431 - STROMINGER (J.L.), PARK (J.T.) and THOMPSON (R.E.) - Composition of the
cell wall of Staphylococcus aureus : its relation to the mechanism of
action of penicillin.
J. Biol. Chem., 1959, 234, (3263-3268).
- 432 - METCALFE (L.D.) and SCHMITZ (A.A.) - The rapid preparation of fatty
acid esters for gas chromatographic analysis.
Anal. Chem., 1961, 33, (363-364).

- 433 - MIWA (T.K.), MIKOLAJCZAK (K.L.), EARLE (F.R.) and WOLF (I.A.) - Gas chromatographic characterization of fatty acids. Identification constants for mono and dicarboxylic methyl esters.
Anal. Chem., 1960, 32, (1739-1742).
- 434 - WOODFORD (F.P.) and Van GENT (G.M.) - Gas-liquid chromatography of fatty acid methyl esters : the carbon number as a parameter for comparison of columns.
J. Lipid Res., 1960, I, (188-190).
- 435 - SPINGLER (H.) and MARKERT (F.) - Gaschromatographische Mikrobestimmung von Formyl und Acetylgruppen. insbesondere in Digitalisglykosiden.
Mikrochim. Acta, 1959, (122-128).
- 436 - MORGAN (S.O.) and LOWRY (H.H.) - Dielectric polarization of some pure organic compounds in the dissolved, liquid and solid states.
J. Phys. Chem., 1930, 34, (2385-2432).
- 437 - FONTANGES (R.), HERITIER (P.) et COEUR (P.) - Une méthode de microspectrographie infra-rouge applicable aux lipides.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, (1223-1227).
- 438 - STAHL (E.) - Dunnschicht - Chromatographic Methode, Einflussfaktoren und einige Anwendungsbeispiele.
Pharmazie, 1956, II, (633-637).
- 439 - STAHL (E.) - Dunnschicht - Chromatographie.
Chem. Z., 1958, 82, (323-329).
- 440 - Thin layer chromatography
E. STAHL Ed.
Academic Press, 1964, 560 pages.
- 441 - WAGNER (H.) - Neuere Ergebnisse auf dem Gebiet der Isolierung und Analytik von Phosphatiden und Glycolipiden.
Fette-Seifen-Anstrichmittel, 1960, 12, (III5-III23).
- 442 - SCRIGNAR (C.B.) and FERRANS (V.J.) - The paper chromatography of cerebroside and sulfatides of brain tissue.
Fed. Proc., 1960, 19, (219).
- 443 - MANGOLD (H.K.) and KAMMERECK (R.) - New methods of analysing industrial aliphatic lipids.
J. Am. Oil Chemists' Soc., 1962, 39, (201-206).
- 444 - KAUFMANN (H.P.) und MAKUS (Z.) - Die Dünnschicht - Chromatographie auf dem Fettgebiet I : Trennung von Modell - Mischungen.
Fette-Seifen. Anstrichmittel, 1960, 62, (1014-1020).

C H A P I T R E I I I

- 445 - KABAT (E.A.) and BERG (D.) - Dextran - an antigen in man.
J. Immunol., 1953, 70, (514-532).
- 446 - MAURER (P.H.) - Dextran, antigen in man.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1953, 83, (879-884).
- 447 - Pharmacopée française,
7ème édition, 1949, p. 401.
- 448 - KEENE (W.R.), SILBERMAN (H.R.) and LANDY (M.) - Observations on the pyrogenic response and its application to the bioassay of endotoxin.
J. Clin. Invest., 1961, 40, (295-301).

C H A P I T R E I V

- 449 - DUMAS (J.) et coll.
Bactériologie médicale,
Flammarion édit., Paris 1958.
- 450 - KOLMER (J.A.) and BOERNER (F.) - Approved laboratory technic,
(3ème edit.), ch. 29.
Appleton Century and Co edit., New-York, 1941.
- 451 - BOERNER (F.) and LUKENS (M.) - Methods for determining optimum dose and sensitivity of antigens used in Wasserman test.
Am. J. Clin. Path., 1937, 7, (33-41).
- 452 - LEPINE (P.) et SOHIER (R.) - Techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus.
Masson édit., Paris, 1954.

C H A P I T R E V

- 453 - COLOBERT (L.), KIRN (A.), SERVANT (P.) et MONTAGNON (B.) - Les propriétés lytiques du sérum. III - Influence chez le singe de la vaccination anti-typhoparatyphoïdique sur la teneur en obsistine.
Ann. Inst. Pasteur, 1961, 100, (600-612).

- 454 - BONET-MAURY (P.), JUDE (A.) et SERVANT (P.) - La mesure statistique de la virulence et de l'immunité. Application à l'étude de la virulence du bacille typhique et à la mesure du pouvoir immunisant des toxines anti-typhoïdiques.
Rev. Immunol., 1954, 18, (21-49).

C H A P I T R E VI

- 455 - BONNEFOI (A.) et GRABAR (Mme J.) - Contrôle de l'efficacité des vaccinations antitypho-paratyphoïdiques : le test de séro-protection.
Ann. Inst. Pasteur, 1947, 73, (259-265).
- 456 - FELIX (A.) and PITT (R.M.) - A new antigen of B.typhosus; its relation to virulence and to active and passive immunisation.
Lancet, 1934, 227, (186-191).
- 457 - GRABAR (Mme J.) et LE MINOR (Mme S.) - Etude critique de diverses méthodes utilisées pour apprécier l'activité d'un vaccin anti-typhoïdique.
Ann. Inst. Pasteur, 1955, 88, (601).

C H A P I T R E VII

(néant)

C H A P I T R E VIII

- 458 - BOYDEN (S.V.) - Adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera.
J. Exptl. Med., 1951, 93, (107-120).
- 459 - STAVITSKY (A.B.) - Micromethods for study of proteins and antibodies; procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells.
J. Immunol., 1954, 72, (360-367).

C H A P I T R E IX

- 460 - ROSCOE (B.) - Handbook on genetically standardized JAX mice.
Jackson Memorial Laboratory Bar Harbor, Maine (U.S.A.) 1962.
- 461 - STEWART (H.L.), SNELL (K.C.), DUNHAM (L.J.) and SCHLYEN (S.M.) - Trans-
plantable and transmissible tumors of animals.
Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., 1959.

D I S C U S S I O N

- 462 - DAUCHY (S.) et ASSELINEAU (J.) - Sur les acides gras des lipides
d'*Escherichia coli* - Existence d'un acide $C_{17}H_{32}$ contenant un cycle
propanique.
C.R. Acad.Sci. Paris 1960, 250, (2635-37).
- 463 - AKASI (S.) - Fat substance obtained from the typhoid bacillus of mice.
J. Biochem. (Japan) 1939, 29, (13-20).
- 464 - CMELIK (S.) - Zur Kenntnis der Lipide von Typhusbakterien V. Mitteil
über Bakterienlipide.
H.S. Zeitschr. Physiol. Chem., 1955, 299, (227),
- 465 - CHO (K.Y.) and SALTON (M.R.J.) - Fatty acid composition of bacterial
membrane and wall lipids.
Biochim. Biophys. Acta, 1966, 116, (73-79).
- 466 - RAPPORT (M.M.) - Structure and specificity of the lipid haptens of
animal cells.
J. Lipid Research, 1961, 2, (25-36).
- 467 - KASAI (N.) et coll. - non publié, cité par KASAI et coll. (233).
- 468 - COLOBERT (L.), KIRN (A.), SERVANT (P.) et MONTAGNON (B.) - Les proprié-
tés lytiques du sérum. III - Influence chez le singe de la vaccination
antityphoparatyphoïdique sur la teneur en obsistine.
Ann. Inst. Pasteur, 1961, 100, (600-612).
- 469 - FEITZ (J.) - Contribution à l'étude des propriétés lytiques du sérum
sanguin humain vis à vis d'*Eberthella typhosa*.
Thèse de Doctorat en pharmacie, Strasbourg, 1963, n° 832.

- 470 - CIRODDE (M.) - Contribution à l'étude des propriétés bactériolytiques du sérum au cours de la vaccination contre les salmonelloses.
Thèse de Doctorat en médecine, Lyon, 1963, n° 180.
- 471 - HALPERN (B.N.), BIOZZI (G.) et STIFFEL (C.) - Action de l'extrait microbien Wxb 3I48 sur l'évolution des tumeurs expérimentales.
dans HALPERN (B.) "Rôle du système réticulo-endothélial dans l'immunité antibactérienne et antitumorale.
Editions du CNRS, 1963, p. 221-236.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(par ordre alphabétique)

Le (ou les) numéros qui suit chaque nom d'auteur correspond à la référence bibliographique donnée dans le chapitre précédent).

A

- ADAMS (J.R.) - voir HARTWELL - 84.
AKASI (S.) - 463.
ALAMITA (E.) - v. MESROBEANU (I.) - 181.
AMANO (T.) - 191.
ANACKER (R.L.) - 62.
 - v. HASKINS (W.T.) - 66.
 - v. FUKUSHI (K.) - 64.
 - v. MILNER (K.C.) - 63.
 - v. RIBI (E.) - 42, 61, 159.
ANDERSON (T.H.) - v. FREEMAN (G.G.) - 28.
ANDERVONT (H.B.) - 396.
 - v. SHEAR (M.J.) - 367.
ANZAI (H.) - v. NETER (E.) - 216, 389.
AOKI (Y.) - v. KASAI (N.) - 209.
APITZ (K.) - 397.
ARAKI (M.) - v. TAKEDA (Y.) - 217.
ARGOUEDELIS (A.D.) - v. RINEHART (K.L.) - 97.
ARNAUD (L.E.) - v. RAFFEL (S.) - 360.
ASSELINEAU (J.) - 205.
 - v. DAUCHY (S.) - 462.
ATKINS (E.) - 264.
ATWOOD (R.P.) - v. KASS (E.H.) - 272.

AUZINS (I.) - 321.
AXELROD (A.E.) - v. STINE BRING (W.R.) - 293.

B

BAILLEY (G.H.) - v. GAANER (R.E.) - 373.
BAKER (E.E.) - 39.
BALLOU (C.E.) - 395.
BARNES (J.M.) - 345.
BARRY (G.T.) - v. GOEBEL (W.F.) - 190.
BARTA (G.) - 60.
BASS (J.A.) - v. HIGGINBOTHAM (R.D.) - 391.
BAYLEY (S.T.) - v. SCHOCHER (A.J.) - 200.
BEARD (M.V.) - v. KUNIN (C.M.) - 69.
BECKMAN (I.) - v. WESTPHAL (O.) - 143.
BEESON (P.B.) - 254, 261.
BELCHER (R.) - 412.
BENACERRAF (B.) - v. BIOZZI (G.) - 329.
BENACERRAF (B.) - v. HALPERN (B.N.) - 328.
BENACERRAF (B.) - v. THORBECKE (G.J.) - 320.
BENDICH (A.) - 221.
BENNET (I.L.) - v. PETERSDORF (R.G.) - 268, 269.
BERG (D.) - v. KABAT (E.A.) - 445.
BERNHEIM (A.Z.) - v. GERBER (I.E.) - 401.
BERNSTOCK (L.) - v. WHITE (R.G.) - 362.
BINKLEY (F.) - 90.
 - v. GOEBEL (W.F.) - 38.
BIOZZI (G.) - 329.
 - v. HALPERN (B.N.) - 328, 471.
BISERTE (G.) - v. BOULANGER (P.) - 423.
BISSET (K.A.) - 11.
BISTER (F.) - v. WESTPHAL (O.) - 52.
BLADEN (H.A.) - 12.
BLASS (J.) - 426.
BOAS (N.F.) - 424.
BOBOSCH (K.) - v. WEIDEL (W.) - 107.
BOEHME (D.) - v. DUBOS (A.J.) - 309.
BOERNER (F.) - 451.
 - v. KOLMER (J.A.) - 450.
BOGATKO (F.H.) - v. NAUTS (H.C.) - 385.
BOIVIN (A.) - 19, 20, 21, 22, 23, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 25
BONET-MAURY (P.) - 454.
BONHAG (R.S.) - v. WEISS (D.W.) - 393.
BONNEFOI (A.) - 455.
BORDET (J.) - 342.

BOROFF (D.A.) - 178, 179.
BOULANGER (P.) - 423.
BOULAYE (J.) - v. CREACH (O.) - 404.
BOURRILLON (R.) - 427.
 - v. MICHON (J.) - 405.
BOYDEN (S.V.) - 458.
BOYER (F.) - v. CHEDID (L.) - 262.
BOWMAN (H.S.) - v. PUTNAM (R.C.) - 386.
BRADNER (W.T.) - 383.
BRANDIS (H.) - 298.
BRAUDE (A.I.) - 297.
 - v. NOLL (H.) - 274, 275.
BRAUN (O.H.) - v. KAUFFMANN (F.) - 136.
BROWN (A.D.) - 15.
BROWN (B.A.) - v. KELLY (L.S.) - 330.
BIBEL (H.C.) - v. NICHOLAS (P.S.) - 350.
BUMBERGS (P.) - v. STEVENS (C.L.) - 121.
BURGER (M.) - 93.
BURK (D.) - v. WOODS (M.) - 287, 288.
BURTON (A.J.) - 67.

C

CALVERY (H.O.) - v. Mc CLOSKEY (W.T.) - 253.
CAROZZA (F.A.) - v. GREISMAN (S.E.) - 258.
CARTER (H.E.) - v. BURTON (A.J.) - 67.
CHALLINOR (S.W.) - v. FREEMAN (G.G.) - 27.
CHAPMAN (G.B.) - 16.
CHARGAFF (E.) - v. BENDICH (A.) - 221.
CHEDID (L.) - 262.
 - v. SKARNES (R.C.) - 296.
CH'EN (C.J.) - v. CHENG (W.F.) - 277.
CHENG (W.F.) - 277.
CHO (K.Y.) - 465.
CIRODDE (M.) - 470.
CLARK (W.R.) - 124.
 - v. LANDY (M.) - 240.
CLARKE (D.A.) - v. BRADNER (W.T.) - 383.
 - v. THORBECKE (G.J.) - 320.
CMELIK (S.) - 464.
COE (H.C.) - v. MANWARING (W.H.) - 333.
COEUR (P.) - v. FONTANGES (R.) - 437.
COHEN (P.P.) - 415.
COLEY (W.B.) - 364.

COLOBERT (L.) - I, 59, 318, 326, 327, 416, 453, 468.
- v. CREACH (O.) - 88, 404.
COMBES (R.) - v. STAUB (A.M.) - 246.
CONDIE (R.M.) - 347, 355.
CONNOR (D.G.) - 271.
CONOLLY (J.M.) - v. WHITE (R.G.) - 361.
COONS (A.H.) - v. WHITE (R.G.) - 361.
COOPER (F.S.) - v. ZAHL (P.A.) - 375.
COOPER (G.N.) - v. STUART (A.E.) - 337.
CO TUI - 51.
COURTOT (F.) - v. BOULANGER (P.) - 423.
CRANSTON (W.I.) - 267.
- v. GERBRANDY (J.C.) - 266.
- v. SNELL (E.S.) - 270.
CREACH (O.) - 58, 88, 404.
- v. COLOBERT (L.) - I, 59.
CRUMPTON (M.J.) - 114, 119, 208.

D

DANIELER (F.A.) - v. STEVENS (C.L.) - 121.
DAUCHY (S.) - 462.
DAVIES (D.A.L.) - 25, 36, 65, 92, 101, 109, 112, 113, 208, 218.
- v. Mac LENNAN (A.P.) - 110, 111.
- v. CRUMPTON (M.J.) - 114, 119.
DELAUNAY (A.) - v. BOIVIN (A.) - 251.
De OME (K.B.) - v. WEISS (D.W.) - 393.
DIENA (B.B.) - v. GRIFFITHS (B.W.) - 68.
DIGEON (M.) - 45, 173.
- v. RAYNAUD (M.) - 46.
DIRHEIMER (G.) - 411.
DOBSON (E.L.) - v. KELLY (L.S.) - 330.
DONNELLY (A.J.) - v. PUTNAM (R.C.) - 386.
DRAGHICI (D.) - v. MESROBEANU (I.) - 181.
DREYWOOD (R.) - 409.
DUBOS (R.J.) - 308, 309.
- v. SCHAEGLER (R.W.) - 289, 292.
DUKES (C.D.) - v. RAFFEL (S.) - 360.
DUMAS (J.) - 449.
DUNHAM (L.J.) - v. STEWART (H.L.) - 461.
DURON (O.S.) - 417.
- v. NOWOTNY (A.M.) - 57.

E

EARLE (F.R.) - v. MIWA (T.K.) - 433.
EDSTROM (R.D.) - 161.
EGAMI (F.) - v. HOMMA (J.Y.) - 47.
EICHENBERGER (E.) - v. WESTPHAL (O.) - 55, 228, 229.
EIDINGER (D.) - v. GLEGG (R.E.) - 429.
ELSON (L.A.) - 413.
ENTRESSANGLES - v. CREACH (O.) - 88.

F

FARTHING (J.R.) - 353, 354.
FAURE (M.) - 422.
FEITZ (J.) - 469.
FELIX (A.) - 122, 456.
FERRANS (V.J.) - v. SCRIGNAR (C.B.) - 442.
FIELD (T.E.) - 304.
FINE (J.) - 284.
- v. RUTENBURG (S.H.) - 263.
FINKELSTEIN (R.A.) - v. ANACKER (R.L.) - 62.
FISCHER (J.) - 311.
FISKE (C.H.) - 421.
FLEMING (D.S.) - v. GREENBERG (L.) - 344.
FLUSSER (B.A.) - v. ROBINSON (E.S.) - 50.
FOGG (L.C.) - 372.
FOLKERS (K.) - 224..
FONTANGES (R.) - 437.
FOWLER (G.A.) - v. NAUTS (H.C.) - 385.
FRAENKEL (D.) - 156..
- v. ROTHFIELD (L.) - 155.
FRANK (H.) - v. MARTIN (H.H.) - 4, 202.
- v. WEIDEL (W.) - 48, 87.
FREDERICQ (P.) - 187, 189.
FREEDMAN (H.H.) - 259, 260, 276, 282, 283.
FREEMAN (G.G.) - 27, 28, 29, 30.
FREEMAN (M.E.) - v. WEBSTER (M.E.) - 123.
FREIMAN (V.B.) - 392.
FRENKEL (A.W.) - v. HICKMAN (D.D.) - 14.
FRETER (R.) - 176.
FREUND (J.) - 358, 359.
FROMME (I.) - 78, 108.
- v. DAVIES (D.A.L.) - 101.
- v. WESTPHAL (O.) - 100.

FUKASAWA (T.) - I47, I48, I49, I50.
FUKUI (G.M.) - 335.
FUKUSHI (K.) - 64.
 - v. MILNER (K.C.) - 63.
 - v. RIBI (E.) - 42.
FUKUYAMA (S.) - v. HOMMA (J.Y.) - I95.

G

GAINES (M.) - v. JOHNSON (A.G.) - 346.
GALLUT (J.) - I74.
 - v. GRABAR (P.) - I75.
GARNER (R.E.) - 373.
GARSON (W.) - v. TAUBER (H.) - 2I0.
GELIS (C.) - v. CREACH (O.) - 404.
GEORGESCO (M.) - v. MESROBEANU (I.) - I8I.
GERBER (I.E.) - 40I.
GERBRANDY (J.C.) - 266.
GERLOUGH (T.D.) - v. PALMER (J.W.) - 49.
GHALAMBOR (M.A.) - v. HEATH (E.C.) - I27.
GLADSTONE (G.P.) - v. HEYNINGEN (W.E. Van) - I80.
GLEDHILL (A.W.) - 3I4.
GLEGG (R.E.) - 429.
GOEBEL (F.) - v. HAMMER (D.) - 265.
GOEBEL (W.F.) - 38, 8I, I90.
 - v. AMANO (T.) - I9I.
 - v. BAKER (E.E.) - 39.
 - v. BINKLEY (F.) - 90.
 - v. JASAITIS (M.A.) - 82, 249.
 - v. RUDE (E.) - I92.
 - v. TAL (C.) - 2I9.
GOOD (R.A.) - v. CONDIE (R.M.) - 347, 355.
GOODALE (F.) - v. GRANSTON (W.I.) - 267.
 - v. SNELL (E.S.) - 270.
GOODE (G.) - v. RIBI (E.) - 6I, I64.
GORZYNSKI (E.A.) - v. NETER (E.) - 2I6, 389.
 - v. SUZUKI (T.) - 7I.
GRABAR (Mme J.) - 457.
 - v. BONNEFOI (A.) - 455.
CRABAR (P.) - I75, 247.
 - v. GALLUT (J.) - I74.
 - v. HORNUS (G.J.P.) - 245.
GRATIA (A.) - 365.

GREENBERG (L.) - 344.
- v. GRIFFITHS (B.W.) - 68.
GREISMAN (S.E.) - 258.
GRIFFITHS (B.W.) - 68.
GROLLMAN (A.P.) - 157.

H

HALMAGYI (N.E.) - v. KUNIN (C.M.) - 69.
HALPERN (B.N.) - 328, 471.
- v. BIOZZI (G.) - 329.
HAMMAMURA (N.) - v. HOMMA (J.Y.) - 47.
HAMMER (D.) - 265, 352.
HAMMERLING (U.) - v. WESTPHAL (O.) - 143.
HANDMAN (M.S.) - v. WALKER (E.L.) - 376.
HARA (I.) - v. KUROKAWA (M.) - 206.
HARTWELL (J.L.) - 84.
HASKINS (W.T.) - 66, 241, 418.
- v. ANACKER (R.L.) - 62.
- v. FUKUSHI (K.) - 64.
- v. MILNER (K.C.) - 63.
- v. RIBI (E.) - 41, 42, 61, 159, 207, 242.
HEATH (E.C.) - 127.
- v. EDSTROM (R.D.) - 161.
HEGEMANN (F.) - 323.
HELLER (J.H.) - 338.
HENDERSON (D.W.) - 37.
HERITIER (P.) - v. FONTANGES (R.) - 437.
HEYNINGEN (W.E.) - 180.
HEYNS (K.) - 125.
HICKMAN (D.D.) - 14.
HIGGINBOTHAM (R.D.) - 391.
HOARE (D.S.) - 425.
HOFFMAN (R.G.) v. SUTER (E.) - 295.
HOLT (L.B.) - v. FARTHING (J.R.) - 354.
- v. BARNES (J.M.) - 345.
- v. Mac LEAN (I.H.) - 343.
HOMMA (J.Y.) - 47, 193, 194, 195, 196, 197.
HOPE (D.) - v. CO TUI - 51.
HORECKER (B.L.) - v. FRAENKEL (D.) - 156.
- v. OSBORN (M.J.) - 117, 128, 153.
- v. ROSEN (S.M.) - 154.
HORIE (K.) - v. HOMMA (J.Y.) - 194.
HORNE (R.W.) - v. SALTON (M.R.J.) - 10.

HORNICK (R.B.) - v. GREISMAN (S.E.) - 258.
HORNUS (G.J.P.) - 245.
HOTTA (K.) - v. KUROKAWA (M.) - 206.
HOUWINK (A.L.) - 5, 6.
HOWARD (J.G.) - 281, 315, 334.
- v. FIELD (T.E.) - 304.
HOWARD (T.) - v. WOODS (M.) - 288.
HOYER (B.H.) - v. RIBI (E.) - 164.
HSIN (T.C.) - v. CHENG (W.F.) - 277.
HUANG (J.S.) - v. RAFFEL (S.) - 360.
HURNI (H.) - 310.
- v. WESTPHAL (O.) - 229.
HUTCHINSON (A.M.) - v. CRUMPTON (M.J.) - 114, 208.
HUTNER (S.H.) - v. ZAHL (P.A.) - 375.
HYDE (R.R.) - v. GARNER (R.E.) - 373.

I

IKAWA (M.) - 215, 225, 226.
INGRAM (V.M.) - 203.
IIO (M.) - v. GREISMAN (S.E.) - 258.
ISSARTEL (G.) - v. CREACH (O.) - 404.
ITO (F.) - v. HOMMA (J.Y.) - 196.
IVANOVICS (G.) - 186.

J

JANN (B.) - v. WESTPHAL (O.) - 143.
JANN (K.) - v. WESTPHAL (O.) - 143.
JANOFF (A.) - 286.
JENKIN (C.R.) - 177, 331.
JENSEN (S.B.) - v. MERGENHAGEN (S.E.) - 223.
JESAITIS (M.A.) - 82, 249.
- v. GOEBEL (W.F.) - 81.
JOHNS (R.G.S.) - v. WHITE (R.G.) - 362.
JOHNSON (A.G.) - 280, 346, 357.
- v. LANDY (M.) - 163, 348.
- v. WEBSTER (M.E.) - 162.
JOHNSON (R.B.) - 220.

JOKURA (K.) - v. NIKAIDO (H.) - 151.
JOLLES (P.) - 79.
- v. WHITE (R.G.) - 363.
JOSEPH (N.) - v. WESTPHAL (O.) - 100.
JUDE (A.) - v. BONET-MAURY (P.) - 454.

K

KABAT (E.A.) - 445.
KALEY (G.) - v. JANOFF (A.) - 286.
KAMMERECK (R.) - v. MANGOLD (H.K.) - 443.
KAO (N.C.) - v. CHENG (W.F.) - 277.
KASAI (N.) - 209, 233, 467.
- v. TAKEDA (Y.) - 217.
KASS (E.H.) - 272.
- v. CONNOR (D.G.) - 271.
KAUFFMANN (F.) - 135, 136, 137.
KAUFMANN (H.P.) - 444.
KEENE (W.R.) - 255, 448.
KEIDERLING (W.) - v. WESTPHAL (O.) - 55, 227.
KELLENBERGER (E.) - 18, 75.
KELLY (L.S.) - 330.
KEMBLE (A.R.) - 414.
KIESSLING (G.) - v. HEYNS (K.) - 125.
KIM (Y.B.) - v. WATSON (D.W.) - 252, 256.
KIRN (A.) - v. COLOBERT (L.) - 326, 327, 453, 468.
KISER (J.S.) - 312.
KLARNER (P.) - 382.
KLEINBERG (W.) - v. FREEDMAN (H.H.) - 282.
KNIGHT (S.G.) - v. QUINNEL (C.M.) - 118.
KOCH (G.) - 198.
- v. WEIDEL (W.) - 107.
KOEPLI (J.B.) - v. IKAWA (M.) - 215, 225, 226.
KOLMER (J.A.) - 450.
KOPACKA (B.) - v. STOCKER (B.A.D.) - 139.
KRUEGER (L.) - v. KAUFFMANN (F.) - 137.
KUJOMOTO (A.) - v. STEVENS (C.L.) - 121.
KULKARNI (M.V.) - 80.
KUNIN (C.M.) - 69.
KUROKAWA (M.) - 206.

L

LANDY (M.) - 163, 240, 243, 307, 348.

- v. ANACKER (R.L.) - 62.
- v. FUKUSHI (K.) - 64.
- v. HASKINS (W.T.) - 66, 241.
- v. JOHNSON (A.G.) - 346.
- v. KEENE (W.R.) - 255, 448.
- v. MICHAEL (J.G.) - 332.
- v. MILNER (K.C.) - 63.
- v. RIBI (E.) - 41, 42, 61, 159, 207, 242.
- v. WEBSTER (M.E.) - 123, 162.
- v. WHITBY (J.L.) - 301.
- v. WOODS (M.) - 287, 288.

LARSON (C.L.) - v. ORMSDEE (R.A.) - 212.

- v. RIBI (E.) - 164.

LASZLO (D.) - v. LEWISOHN (R.) - 400.

LEA (C.H.) - 402.

LEATHERWOOD (J.M.) - v. SMITH (E.J.) - 120.

LEDERER (E.) - v. BALLOU (C.E.) - 395.

- v. JOLLES (P.) - 79.
- v. VILKAS (E.) - 394.
- v. WHITE (R.G.) - 362, 363.

LE MINOR (Mme S.) - v. GRABAR (Mme J.) - 457.

LEONARDI (A.) - 388.

LEPINE (P.) - 452.

LEUCHTENBERGER (R.) - v. LEWISOHN (R.) - 400.

LEUTGEB (W.) - v. WEIDEL (W.) - 48.

LEVIN (D.H.) - 142.

LEWISOHN (R.) - 400.

LINDENBERG (W.) - v. HEYNS (K.) - 125.

LINDH (H.) - v. KISER (J.S.) - 312.

LINZ (R.) - v. GRATIA (A.) - 365.

LOWRY (H.H.) - v. MORGAN (S.O.) - 436.

LUDERITZ (O.) - 102, 238.

- v. DAVIES (D.A.L.) - 101.
- v. FROMME (I.) - 78, 108.
- v. HAMMER (D.) - 265, 352.
- v. KAUFFMANN (F.) - 135, 136, 137.
- v. MIHICH (E.) - 380.
- v. SCHRAMM (G.) - 83.
- v. STAUB (A.M.) - 96, 133.
- v. SUTHERLAND (T.W.) - 158.
- v. WESTPHAL (O.) - 52, 54, 55, 91, 100, 103, 104, 141, 143, 227, 228, 229, 244.

LUKENS (M.) - v. BOERNER (F.) - 451.

LURIA (S.R.) - v. UCHIDA (T.) - 140.

M

- Mc CARTHY (C.G.) - v. MANILLA (G.T.) - 384.
Mc CLOSKEY (W.T.) - 253.
Mc DERMOTT (K.) - v. FREUND (J.) - 358.
Mc LEAN (I.H.) - 343.
Mc LENNAN (A.P.) - II0, III, II5, II6, 2I4.
Mc LAUGHLIN (J.) - v. CLARK (W.R.) - I24.
Mc PHERSON (H.T.) - v. KEMBLE (A.R.) - 4I4.
Mc PHERSON (I.A.) - v. DAVIES (D.A.L.) - 208.
MACRI (B.J.) - v. BOROFF (D.A.) - I79.
MAKITA (M.) - v. KUROKAWA (M.) - 206.
MAKUS (Z.) - v. KAUFMANN (H.P.) - 444.
MALMGREN (B.) - v. MILNER (K.C.) - 63.
MANDELSTAM (J.) - 20I.
MANGOLD (H.K.) - 443.
MANILLA (G.T.) - 384.
MANWARING (W.H.) - 333.
MARKERT (F.) - v. SPINGLER (H.) - 435.
MARTIN (G.R.) - v. MERCENHAGEN (S.E.) - 2II, 223.
MARTIN (H.H.) - 4, 202.
- v. WEIDEL (W.) - 87.
MAURER (P.H.) - 446.
MELLO (de) (G.C) - v. KISER (J.S.) - 3I2.
MELVIN (E.H.) - v. SCOTT (T.A.) - 4I0.
MERGENHAGEN (S.E.) - 2II, 223.
- v. BLADEN (H.A.) - I2.
MESROBEANU (I.) - I8I.
- v. BOIVIN (A.) - 22.
- v. MESROBEANU (L.) - I82, I83, I84, I85.
MESROBEANU (L.) - I82, I83, I84, I85.
- v. MESROBEANU (I.) - I8I.
- v. BOIVIN (A.) - I9, 20, 2I, 22, I67, I68, I69, I70, I7I.
METCALFE (L.D.) - 432.
MICHAEL (J.G.) - v. WHITBY (J.L.) - 30I.
MICHAEL (J.G.) - 332.
MICHAILOUSKY (N.) - v. SHWARTZMAN (G.) - 366.
MICHON (J.) - 405.
MICHON (R.) - v. BOURRILLON (R.) - 427.
MIHICH (E.) - 380, 390.
- v. NETER (E.) - 379.
MIKOLAJCZAK - v. MIWA (T.K.) - 433.
MILES (A.A.) - 3I, 2I3.
MILLER-SMIDT (E.) - v. AMANO (T.) - I9I.
MILNER (K.C.) - 63.
- v. ANACKER (R.L.) - 62.
- v. FUKUSHI (K.) - 64.
- v. HASKINS (W.T.) - 66, 24I.
- v. RIBI (E.) - 40, 4I, 42, 6I, I59, I64, 207, 242.

MINAIRE (Y.) - v. CREACH (O.) - 404.
MITICA (N.) - v. MESROBEANU (L.) - 182, 183, 184, 185.
MIWA (T.K.) - 433.
MONTAGNON (B.) - v. COLOBERT (L.) - 453, 468.
MONTREUIL (J.) - 406.
MORA (P.T.) - 86.
- v. OROSZLAN (S.I.) - 85.
MORGAN (S.O.) - 436.
MORGAN (W.T.J.) - 32, 33, 34, 35, 89, 95, 236, 237.
- v. DAVIES (D.A.L.) - 36, 65, 218.
- v. ELSON (L.A.) - 413.
- v. HENDERSON (D.W.) - 37.
MORNICK (R.B.) - v. GREISMAN (S.E.) - 258.
MOSE (J.R.) - 378.
MOSIMANN (W.) - v. DAVIES (D.A.L.) - 36, 218.
MUDD (S.G.) - v. IKAWA (M.) - 215, 225, 226.
MUNOZ (J.) - 291.
MURRAY (R.G.E.) - 13, 17.

N

NAGASAWA (M.) - 231.
NAKANO (M.) - 273, 336.
NAOI (M.) - v. HOMMA (J.Y.) - 47.
NAUTS (H.C.) - 385.
NETER (E.) - 216, 239, 379, 389.
- v. LUDERITZ (O.) - 238.
- v. MIHICH (E.) - 380, 390.
- SUZUKI (T.) - 71.
- v. WESTPHAL (O.) - 228.
- v. WHANG (H.Y.) - 70, 72.
NICHOLAS (P.S.) - 350.
- v. MANILLA (G.T.) - 384.
NIEMANN (C.) - v. IKAWA (M.) - 215, 225, 226.
NIKAIDO (H.) - 144, 145, 146, 151, 152.
- v. FUKASAWA (T.) - 147, 148, 149, 150.
NISHIMURA (E.T.) - v. PUTNAM (R.C.) - 386.
NOLL (H.) - 274, 275.
NOWOTNY (A.) - 222, 232, 234, 235, 278, 279.
- v. DURON (O.S.) - 417.
- v. HAMMER (D.) - 352.
- v. JOHNSON (A.G.) - 280.
- v. NETER (E.) - 216.
- v. NOWOTNY (A.M.) - 57.
- v. WESTPHAL (O.) - 229.

NOWOTNY (A.M.) - 57.
NUTTEN (A.J.) - v. BELCHER (R.) - 412.

O

ODAKA (T.) - v. KASAI (N.) - 209.
- v. TAKEDA (Y.) - 217.
OKITSU (F.) - v. NAKANO (M.) - 336.
OLD (L.J.) - v. THORBECKE (G.J.) - 320.
O'NEILL (G.J.) - 56.
ORMSBEE (R.A.) - 212.
OROSZLAN (S.I.) - 85.
OSBORN (M.J.) - 117, 128, 129, 153.
- v. FRAENKEL (D.) - 156.
- v. GROLLMAN (A.P.) - 157.
- v. ROTHFIELD (L.) - 155.
OUDIN (J.) - v. GRABAR (P.) - 247.

P

PALMER (J.W.) - 49.
PARANT (M.) - v. CHEDID (L.) - 262.
PARK (J.T.) - v. STROMINGER (J.L.) - 431.
PARTRIDGE (S.M.) - 428, 430.
- v. MORGAN (W.T.J.) - 33, 34, 35, 89.
PASTERNAK (V.Z.) - v. HELLER (J.H.) - 338.
PAULSEN (H.) - v. HEYNS (K.) - 125.
PELZER (H.) - v. WEIDEL (W.) - 77.
PERKINS (H.R.) - 2.
PERLMAN (E.) - v. BAKER (E.E.) - 39.
- v. BINKLEY (F.) - 90.
- v. GOEBEL (W.F.) - 38.
PERRINE (T.D.) - v. RIBI (E.) - 40, 164.
PETERSDORF (R.G.) - 257, 268, 269.
PHILLIPS (G.B.) - 403.
PILLEMER (L.) - v. LANDY (M.) - 307.
- v. WARDLAW (A.C.) - 324.
PIRIE (N.W.) - v. MILES (A.A.) - 31, 213.
PITT (R.M.) - v. FELIX (A.) - 456.
POMEROY (T.C.) - v. PUTNAM (R.C.) - 386.

PON (G.) - 99.
PORTER (P.) - v. KASS (E.H.) - 272.
POWERS (J.) - v. CO TUI - 51.
PRICE (C.W.) - v. Mc CLOSKEY (W.T.) - 253.
PRIGAL (S.J.) - 387.
PUTNAM (R.C.) - 386.

Q

QUINNEL (C.M.) - 118.

R

RACKER (E.J.) - v. LEVIN (D.H.) - 142.
RAFFEL (S.) - 360.
RAISTRICK (H.) - 26.
RAMON (G.) - 341.
RANSOM (J.P.) - v. HELLER (J.M.) - 338.
RAPPORT (M.M.) - 466.
RATHGEB (P.) - 370, 371.
RAYNAUD (M.) - 46.
 - v. DIGEON (M.) - 45, 173.
 - v. STAUB (A.M.) - 126.
REEVES (P.) - 188.
REIMAN (S.P.) - v. PUTNAM (R.C.) - 386.
RHODES (D.N.) - v. LEA (C.H.) - 402.
RIBBLE (J.C.) - 317.
RIBI (E.) - 40, 41, 42, 61, 159, 164, 207, 242.
 - v. ANACKER (R.L.) - 62.
 - v. FUKUSHI (K.) - 64.
 - v. HASKINS (W.T.) - 66, 241.
 - v. MILNER (K.C.) - 63.
RINEHART (K.L.) - 97.
RITTER (D.B.) - v. RIBI (E.) - 61.
ROBBINS (P.W.) - 132.
 - UCHIDA (T.) - 140.
ROBERTS (R.S.) - 44.
ROBINSON (E.S.) - 50.
ROLLINS (E.L.) - v. STEVENS (C.L.) - 121.

RONDLÉ (C.J.M.) - v. Mc LENNAN (A.P.) - II5.
ROSCOE (B.) - 460.
ROSEN (S.M.) - I54.
- v. OSBORN (M.J.) - II7, I28, I53.
ROTHFIELD (L.) - I55.
- v. OSBORN (M.J.) - II7, I28, I53.
ROWLEY (D.) - 302, 303, 305, 306, 3I9, 322, 35I.
- v. HOWARD (J.G.) - 28I, 3I5.
- v. JENKIN (C.R.) - I77, 33I.
RUDE (E.) - I92.
RUTENBURG (A.M.) - v. RUTENBURG (S.H.) - 263.
RUTENBURG (S.H.) - 263.
RYTER (A.) - v. KELLENBERGER (E.) - I8.

S

SAGIN (J.F.) - v. LANDY (M.) - I63.
- v. WEBSTER (M.E.) - I62.
SAITO (K.) - v. NAKANO (M.) - 336.
SALTON (M.R.J.) - 3, 7, 8, 9, IO, 74, I99, 204.
- v. CHO (K.Y.) - 465.
- v. INGRAM (V.M.) - 203.
SAMBROOK (C.M.) - v. BELCHER (R.) - 4I2.
SAMOUR (D.) - v. JOLLES (P.) - 79.
- v. WHITE (R.G.) - 363.
SCHAEDLER (R.W.) - 289, 292.
- v. DUBOS (R.J.) - 308, 309.
SCHEPPLER (N.) - v. MONTREUIL (J.) - 406.
SCHIFFMANN (E.) - v. MERGENHAGEN (S.E.) - 2II, 223.
SCHLYEN (S.M.) - v. STEWART (H.L.) - 46I.
SCHMITZ (A.A.) - v. METCALFE (L.D.) - 432.
SCHNELL (G.W.) - v. SLEIN - IO5, IO6.
SCHOCHER (A.J.) - 200.
SCHONHOLZER (G.) - v. WESTPHAL (O.) - 229.
SCHRAMM (G.) - 83.
SCHRIFT (M.H.) - v. CO TUI - 5I.
SCHULMAN (J.A.) - v. PETERSDORF (R.G.) - 257.
SCOTT (T.) - v. NOWOTNY (A.M.) - 57.
SCOTT (T.A.) - 4IO.
SCRIGNAR (C.B.) - 442.
SERVANT (P.) - v. COLOBERT (L.) - 453, 468.
- v. BONET-MAURY (P.) - 454.
SHAPIRO (C.J.) - 374.
SHEAR (M.J.) - 367, 368, 369, 398.
- v. HARTWELL (J.L.) - 84.

SHILO (M.) - 299, 300, 313, 340.
SHINKIN (M.B.) - v. ANDERVONT (H.B.) - 396.
SHOREY (C.D.) - v. BROWN (A.D.) - 15.
SHWARTZMAN (G.) - 366, 399.
SIEVERS (K.) - v. HAMMER (D.) - 265.
SILBERMAN (H.R.) - 255, 448.
SKARNES (R.C.) - 296.
 - v. CHEDID (L.) - 262.
SLEIN (M.W.) - 105, 106..
SMITH (E.E.) - v. RUTENBURG (S.H.) - 263.
SMITH (E.J.) - 120.
SMITH (R.) - v. RIBI (E.) - 159.
SMITH (S.) - v. FRAENKEL (D.) - 156.
SNELL (E.S.) - 270.
 - v. ATKINS (E.) - 264.
 - v. CRANSTON (W.I.) - 267.
 - v. GERBRANDY (J.C.) - 266.
SNELL (K.C.) - v. STEWART (H.L.) - 461.
SNYDER (F.) - 419.
SOHIER (R.) - v. LEPINE (P.) - 452.
SOMOCYI (M.) - 407.
SPINGLER (H.) - 435.
SPITZ (S.) - v. ZAHL (P.A.) - 375.
STAHL (E.) - 438, 439, 440.
STASHAK (P.W.) - v. ANACKER (R.L.) - 62.
STAUB (A.M.) - 94, 96, 126, 130, 131, 133, 138, 246, 248, 408.
 - v. DAVIES (D.A.L.) - 101.
 - v. LUDERITZ (O.) - 102.
 - v. PON (G.) - 99.
 - v. STOCKER (B.A.D.) - 139.
 - v. WESTPHAL (O.) - 244.
STAVITSKY (A.B.) - 459.
STEPHENS (N.) - v. SNYDER (F.) - 419.
STEVENS (C.L.) - 121.
STEWART (H.L.) - 461.
STIERLIN (H.) - v. KAUFFMANN (F.) - 135, 136.
STIFFEL (C.) - v. HALPERN (B.N.) - 471.
STINEBRING (W.R.) - 293.
STIRM (S.) - v. LUDERITZ (O.) - 102.
STOCK (C.C.) - v. BRADNER (W.T.) - 383.
STOCKER (B.A.D.) - 139.
STOLL (R.D.) - v. LEA (C.H.) - 402.
STONE (S.H.) - 356.
STROMINGER (J.L.) - 431.
STUART (A.E.) - 337, 339.
STUART (E.G.) - 349.
SUBBAROW (Y.) - v. FISKE (C.H.) - 421.
SUGIURA (K.) - 381.
 - v. ZAHL (P.A.) - 375.

SULTZER (B.M.) - v. FREEDMAN (H.H.) - 260, 276, 282, 283.
SUTER (E.) - 290, 294, 295.
SUTHERLAND (T.W.) - 158.
SUZUKI (N.) - v. HOMMA (J.Y.) - 193, 194, 195, 196, 197.
SUZUKI (T.) - 71.
SYLVEN (B.) - v. RATHGEB (P.) - 370, 371.

T

TAKEDA (Y.) - 217.
TAL (C.) - 219.
TAUBER (H.) - 210, 420.
THOMAS (L.) - v. WEISSMANN (G.) - 285.
THOMPSON (R.E.) - v. STROMINGER (J.L.) - 431.
THORBECKE (G.J.) - 320.
TINELLI (R.) - v. STAUB (A.M.) - 96, 131, 133, 138.
 - v. STOCKER (B.A.D.) - 139.
TODD (J.P.) - v. O'NEIL (G.J.) - 56.
TOPLEY (W.W.C.) - v. RAISTRICK (H.) - 26.
TRAKATELLIS (A.C.) - v. STINEBRING (W.R.) - 293.
TRAPANI (R.J.) - v. LANDY (M.) - 240.
 - v. RIBI (E.) - 61.
TS'AO (K.H.) - v. CHENG (W.F.) - 277.
TURNER (F.C.) - v. SHEAR (M.J.) - 369.
TURPIN (A.) - v. DIGEON (M.) - 45.

U

UCHIDA (T.) - 140.
 - v. ROBBINS (P.W.) - 132.
ULLMAN (G.E.) - v. SUTER (E.) - 295.
USHIBA (D.) - v. NAKANO (M.) - 336.

V

Van GENT (G.M.) - v. WOODFORD (F.P.) - 434.
Van WINKLE (W.) - v. Mc CLOSKEY (W.T.) - 253.
VILKAS (E.) - 394.
- v. BALLOU (C.E.) - 395.
VINCENT (H.) - 165.

W

WAGNER (H.) - 441.
WACNER (H.N.) - v. GREISMAN (S.E.) - 258.
WAGNER-JAUREGG (Th.) - 24.
WALKER (J.) - 43.
WALKER (E.L.) - 376.
WARDLAW (A.C.) - v. HOWARD (J.G.) - 281, 315, 334.
WATANABE (T.) - v. KASAI (N.) - 209.
WATKINS (W.N.) - v. MORGAN (W.T.J.) - 237.
WATSON (D.W.) - 252, 256.
- v. SCHÖCHER (A.J.) - 200.
WEBSTER (M.E.) - 123, 162,
- v. CLARK (W.R.) - 124.
- v. LANDY (M.) - 163.
- v. HEYNS (K.) - 125.
WEDGWOOD (R.J.) - 325.
WEIDEL (W.) - 48, 77, 87, 107, 250.
- v. KOCH (G.) - 198.
WEISS (D.W.) - 393.
WEISSMANN (G.) - 285.
WELCH (H.) - v. Mc CLOSKEY (W.T.) - 253.
WENDT (F.) - v. SNELL (E.S.) - 270.
- v. CRANSTON (W.I.) - 267.
WESTALL (R.G.) - v. PARTRIDGE (S.M.) - 428.
WESTPHAL (O.) - 52, 53, 54, 55, 91, 98, 100, 103, 104, 134, 141, 143,
160, 227, 228, 229, 230, 244, 316.
- v. DAVIES (D.A.L.) - 101.
- v. FROMME (I.) - 78, 108.
- v. HAMMER (D.) - 265, 352.
- KAUFFMANN (F.) - 135, 136, 137.
- v. LUDERITZ (O.) - 102, 238.
- MIHICH (E.) - 380.
- v. NETER (E.) - 216, 379.

WESTPHAL (O.) - v. SCHRAMM (G.) - 83.
- v. STAUB (A.M.) - 94, 96, 133.
- SUTHERLAND (T.W.) - 158.
WHANG (H.Y.) - 70, 72.
WHEAT (R.) - 76.
WHEAT (R.W.) - v. KULKARNI (M.V.) - 80.
- v. SMITH (E.J.) - 120.
WHEAT (R.W.) - v. STEVENS (C.L.) - 121.
WHITBY (J.L.) - 301.
- v. FIELD (T.E.) - 304.
- v. MICHAEL (J.G.) - 332.
- WOODS (M.) - 287.
WHITE (R.G.) - 361, 362, 363.
WILKINSON (J.F.) - 73.
WILLIAMS (R.C.) - v. SALTON (M.R.J.) - 9.
WILSON (J.) - v. FREEMAN (G.G.) - 27.
WILSON (P.W.) - v. QUINNEL (C.M.) - 118.
WINDEL (W.P.) - v. STUART (E.G.) - 349.
WOLF (I.A.) - v. MIWA (T.K.) - 433.
WOLMAN (B.) - v. SHILO (M.) - 313.
WOO (P.W.K.) - v. RINEHART (K.L.) - 97.
WOODFORD (F.P.) - 434.
WOODS (M.) - 287, 288.
WOODS (M.W.) - v. WHITBY (J.L.) - 301.
WOODWARD (T.E.) - v. GREISMAN (S.E.) - 258.
WORK (E.) - v. HOARE (D.S.) - 425.

Y

YAMAMOTO (T.) - v. KASAI (N.) - 209.
YAMAMOTO (A.) - v. KASAI (N.) - 233.
YOSHIMURA (T.) - v. KUROKAWA (M.) - 206.
YOUNG (B.G.) - v. MORA (P.T.) - 86.

Z

ZAHL (P.A.) - 375, 377.
ZAK (S.) - v. CONDIE (R.M.) - 347.
ZELEZNICK (J.D.) - v. OSBORN (M.J.) - 128.
ZOELLER (C.) - v. RAMON (G.) - 341.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	pages I
--------------------	------------

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. - LOCALISATION ET ISOLEMENT DES ENDOTOXINES	5
- Place de l'endotoxine dans la paroi ectoplasmique	5
- Isolement des endotoxines	6
- Purification des endotoxines	9
- Rendement des préparations	10
- Nature de la liaison entre l'endotoxine et l'enveloppe interne	10
- Propriétés physiques des endotoxines	12
CHAPITRE II. - CONSTITUTION CHIMIQUE DES ENDOTOXINES	15
I - LES CONSTITUANTS GLUCIDIQUES	17
- Nature des monosaccharides	17
- Structure des polysaccharides	19

2 - LES CONSTITUANTS PROTEINIQUES	23
3 - LES CONSTITUANTS LIPIDIQUES	26
- Les lipides non liés	26
- Les lipides liés (lipide A)	29
- <u>Composition chimique du lipide A</u>	29
- <u>Propriétés physiques du lipide A</u>	34
- <u>Structure moléculaire du lipide A</u>	35
- <u>Lipide A et complexes artificiels</u>	38
CHAPITRE III: - PROPRIETES BIOLOGIQUES DU LIPIDE A	39
- PROPRIETES BIOLOGIQUES DES POLYSACCHARIDES	40
- PROPRIETES BIOLOGIQUES DE LA FRACTION PROTEINIQUE	41
- PROPRIETES PYROGENES DU LIPIDE A	42
- Rôle de lipide	42
- Mécanisme de l'action pyrogène	44
- POUVOIR LETAL DU LIPIDE A	44
- Rôle du lipide	44
- Mécanisme de l'action létale	46
- ACTION DU LIPIDE A SUR L'IMMUNITE NON SPECIFIQUE	48
- Rôle du lipide	48
- Mécanisme de l'activation de l'immunité non spécifique	49
- PROPRIETES ADJUVANTES DU LIPIDE A	50
- Rôle du lipide A	50
- Mécanisme de l'activité adjuvante	52
- Structures chimiques responsables des propriétés adjuvantes	52
- PROPRIETES ANTITUMORALES DU LIPIDE A	53
- Rôle du lipide A	53
- Structures chimiques responsables de l'activité antitumorale	56
- Mécanisme de l'activité antitumorale	57

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I. - PREPARATION DE LA FRACTION LIPIDIQUE A _{II}	6I
- CULTURE DES BACTERIES	6I
- 1) Préparation du milieu pour boîtes de Roux	6I
- 2) Préparation de l'eau peptonée stérile	62
- 3) Préparation du milieu pour culture industrielle ...	62
- 4) Culture des bactéries	63
- PREPARATION DE LA FRACTION A _{II}	64
- Extraction de l'antigène somatique	64
- Isolement du lipide lié à partir du lipopolysaccharide	66
- Rendement de la préparation	67
- Fractionnement du lipide A brut	67
CHAPITRE II. - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DE LA FRACTION A _{II}	7I
- TECHNIQUES ANALYTIQUES	7I
- DOSAGE DES CONSTITUANTS	7I
- 1) Dosage des glucides réducteurs	7I
- 2) Dosage colorimétrique des oses	72
- 3) Dosage des hexosamines	73
- 4) Dosage des acides aminés	74
- 5) Dosage des acides gras totaux	74
- 6) Dosage des fonctions esters et amides	75
- 7) Dosages divers	76
- IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS	77
- 1) Séparation des acides aminés, oses et osamines ...	77
- 2) Identification des acides aminés	78

- 3) Identification des oses	78
- 4) Identification des osamines	79
- 5) Identification des acides carboxyliques	80
a) Acides gras	80
b) Acides acétique et formique	81
- SPECTROGRAPHIE INFRAROUGE	82
- CHROMATOGRAPHIES SUR COUCHES MINCES	83
- RESULTATS EXPERIMENTAUX	85
- PROPRIETES PHYSIQUES DE LA FRACTION A _{II}	85
- <u>Solubilité</u>	85
- <u>Spectre infrarouge</u>	86
- COMPOSITION CHIMIQUE DE LA FRACTION A _{II} ET DU LIPOPOLYSACCHARIDE CORRESPONDANT	88
- Etude de l'homogénéité de A _{II}	93
- Conclusion	99
CHAPITRE III. - TOXICITE ET PYROGENICITE DE A _{II}	101
1 - PREPARATION DES SUSPENSIONS INJECTABLES DE A _{II}	101
2 - TOLERANCE DES ANIMAUX AUX INJECTIONS DE A _{II}	103
3 - RECHERCHE DE LA DOSE LETALE POUR LA SOURIS	104
- Injection unique	104
- Injections quotidiennes	104
4 - PROPRIETES PYROGENES DE A _{II}	105
- Principe de la mesure	105
MATERIEL ET METHODES	105
RESULTATS	106
CONCLUSIONS	107

CHAPITRE IV. - RECHERCHE D'UNE ACTION EVENTUELLE DE A _{II} sur L'IMMUNITE SPECIFIQUE	I09
I - RECHERCHE DE LA PRESENCE EVENTUELLE D'ANTICORPS AGGLUTINANTS ANTISALMONELLES APRES L'INJECTION DU LIPIDE A _{II}	I09
2 - RECHERCHE DES ANTICORPS SPECIFIQUES VIS A VIS DE LA FRACTION LIPIDIQUE A _{II}	II0
MODE OPERATOIRE	II0
RESULTATS	III
CONCLUSION	III
CHAPITRE V. - INFLUENCE DE A _{II} SUR LE TAUX D'OBSISTINE CHEZ LE SINGE	II3
- MATERIEL ET METHODES	II4
- Titrage de l'obsistine	II4
- Modifications apportées à la méthode originale	II7
1) Appareillage	II7
2) Opacité de la suspension bactérienne	II7
3) Mise en oeuvre de la réaction	II8
4) Expression des résultats	II8
a) Représentation graphique	II8
b) Variations des tracés en fonction du titre des sérums en obsistine. Effet des dilutions de sérum	II9
c) Variations des tracés en fonction du temps de contact entre le sérum et les bactéries ..	I2I
d) Influence de la densité optique du sérum. Intérêt d'une correction	I22
5) Interprétation des résultats	I23
- Protocole expérimental	I23
- RESULTATS	I25
- CONCLUSION	I30

CHAPITRE VI. - RECHERCHE D'UN POUVOIR SEROPROTECTEUR EVENTUEL SUR LE SOURIS DES SERUMS DE SINGES AYANT RECU DES INJECTIONS DE A _{II}	I31
- MODE OPERATOIRE	I31
- RESULTATS	I33
- CONCLUSION	I33
CHAPITRE VII. - INFLUENCE DE L'INJECTION DE LIPIDE A _{II} SUR LE NIVEAU DE L'IMMUNITE NON SPECIFIQUE CHEZ LA SOURIS	I35
- MODE OPERATOIRE	I35
- RESULTATS	I36
- CONCLUSION	I36
CHAPITRE VIII. - PROPRIETES ADJUVANTES DE A _{II}	I37
- MATERIEL ET METHODES	I38
- Animaux	I38
- Produits injectés	I38
- Dosage des anticorps	I39
- RESULTATS	I44
- CONCLUSION	I47

CHAPITRE IX. - RECHERCHE DES PROPRIETES ANTITUMORALES EVENTUELLES DE LA FRACTION A _{II}	I49
I' - RECHERCHE D'UNE ACTION EVENTUELLE DE A _{II} SUR LE SARCOME I DE LA SOURIS	I49
- MATERIEL ET METHODES	I49
- Animaux	I49
- Souche tumorale	I50
- Suspensions injectables de A _{II}	I50
- Inoculations	I50
- Technique expérimentale	I5I
- Coloration des cellules tumorales	I52
- RESULTATS	
a) Effet des injections de A _{II} sur le décès des souris sarcomateuses	I52
b) Etude anatomo-pathologique des tumeurs	I59
2 - RECHERCHE D'UNE ACTION EVENTUELLE DE A _{II} SUR LE SARCOME DE ROUS	I60
- MODE OPERATOIRE	I60
- Technique expérimentale	I60
I) Témoins d'activité	I60
2) Animaux traités par A _{II} en suspension huileuse .	I6I
3) Animaux traités par A _{II} en suspension aqueuse ..	I6I
-Evaluation de l'efficacité	I62
- RESULTATS	I63
- CONCLUSION	I63
D I S C U S S I O N	I7I
C O N C L U S I O N S	I8I
BIBLIOGRAPHIE (par ordre d'arrivée dans le texte)	I83
BIBLIOGRAPHIE (par ordre alphabétique)	227
TABLE DES MATIERES	247

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

**Problèmes posés par l'utilisation des silicones
dans la culture des bactéries**

Vu, le Doyen
J.F. CIER

Le Président de la Thèse
A. CIER

Vu et permis d'imprimer :
Lyon, le 28 Mai 1966

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université
P. LOUIS

